



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/80, 15/04, 9/42, 9/24, 1/15 // (C12N 15/04, C12R 1:885) (C12N 9/42, C12R 1:885) (C12N 9/24, C12R 1:885) (C12N 1/15, C12R 1:885)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/11239</p> <p>(43) 国際公開日 1998年3月19日(19.03.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03268</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月16日(16.09.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/243695 1996年9月13日(13.09.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJ SEIKA KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 渡辺 学(WATANABE, Manabu)(JP/JP) 守屋達樹(MORIYA, Tatsuki)(JP/JP) 青柳 薫(AOYAGI, Kaoru)(JP/JP) 隅田奈緒美(SUMIDA, Naomi)(JP/JP) 村上 健(MURAKAMI, Takeshi)(JP/JP) 〒250-01 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: REGULATORY SEQUENCE OF CELLULASE <i>cbh1</i> GENES ORIGINATING IN <i>TRICHODERMA VIRIDE</i> AND SYSTEM FOR MASS-PRODUCING PROTEINS OR PEPTIDES THEREWITH</p> <p>(54)発明の名称 Trichoderma viride由来のセルラーゼ<i>cbh1</i>遺伝子の制御配列およびそれを用いたタンパク質またはペプチドの大量生産系</p> <p>(57) Abstract Establishment of a system for mass-producing proteins or peptides, particularly a system for mass-producing cellulase in molds such as <i>Trichoderma viride</i>. As the regulatory sequence of cellulase <i>cbh1</i> genes originating in <i>Trichoderma viride</i> can highly express objective proteins, objective proteins, particularly cellulase, can be amply expressed with this sequence. Thus an endoglucanase originating in <i>Humicola insolens</i> has now been successfully produced in a quantity of 15 g/l.</p> <div data-bbox="820 1302 1461 1806"> </div>		

(57) 要約

タンパク質またはペプチドの大量生産系の確立、とりわけTrichoderma virideのような糸状菌におけるセルラーゼの大量生産系を確立した。Trichoderma viride由来のセルラーゼcbhl遺伝子の制御配列が目的タンパク質を高発現させる。よってこの制御配列を用いて目的タンパク質特にセルラーゼを大量発現させることができる。特に、この制御配列によってHumicola insolens 由来のエンドグルカナーゼを15g/L 生産させることに成功した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GU	グアム	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HN	ホンデュラス	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ベトナム
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	大韓民国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KH	カンボジア	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LA	ラオス	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア				
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

*Trichoderma viride*由来のセルラーゼc b h l遺伝子の制御配列およびそれを用いたタンパク質またはペプチドの大量生産系の

発 明 の 背 景

発 明 の 分 野

本発明は、タンパク質またはペプチドの大量生産系に関し、更に詳しくは*Trichoderma viride*由来の制御配列を用いた生産系、さらにこの生産系を用いたタンパク質またはペプチドの生産技術に関する。

背 景 技 術

糸状菌は菌体外にタンパク質、特に酵素を著量分泌することが知られている。たとえば、*Aspergillus* 属はアミラーゼやプロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼといった酵素を分泌し、それらは各種の分野で利用されている。その生産量は、工業的に利用される*Aspergillus niger* の場合グルコアミラーゼを培養液1Lあたり20g 以上、*Aspergillus oryzae*の場合個体培養で1kg あたり50g 程度生産するといわれている（五味勝也：化学と生物(1994), 32, 269）。

さらに、近年これら糸状菌のタンパク質生産性を利用した、目的タンパク質の生産技術についても多くの知見が集積されつつある。たとえば、*Aspergillus nidulans*を宿主に*Mucor miehei*由来レンニン（G.L.Gray, et.al.: Gene (1986), 48, 41）、*Aspergillus niger*を宿主に*Aspergillus ficuum*由来フィターゼ（R.F.M.van.Gorcom, et. al.: European Patent Application(1991), 0420358A1）、*Aspergillus oryzae*を宿主に*Mucor miehei*由来レンニン（T.christensen, et. al.: Bio/Technology (1988), 6, 1419）やリパーゼ（B. Høge-Jensen, et.al.: Lipids (1989), 24, 781）、*Trichoderma reesei*を宿主に*Phlebia radiata*

由来ラッカーゼ (M. Saloheimo, et. al.: Bio/Technology (1991), 9, 987)、*Trichoderma viride*を宿主に*Aspergillus oryzae*由来 α -アミラーゼ (C. Cheng, et. al.: Agric. Biol. Chem. (1991), 55, 1817)、*Acremonium chrysogenum*を宿主に*Fusarium*属由来アルカリプロテアーゼ (森田滋ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集(1993), p.140) 等の糸状菌由来異種タンパク質が生産されてきている。また、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus oryzae*や*Trichoderma reesei*を宿主にしたヒトやウシなどの動物、さらには植物由来のタンパク質生産も確認された。

このように、糸状菌はタンパク質やポリペプチドの優れた生産宿主であることは明らかである。そしてさらに、それを工業的に利用するにあたっては、目的タンパク質の生産性が重要となってくる。この生産性を左右するといわれている要因としては、①宿主内で発現する調節領域 (例えばプロモーターやターミネーターなど) が目的タンパク質を有効かつ大量に転写、翻訳の調節をすること、②翻訳産物が目的とする高次構造 (活性型) をとること、③更にはそれらが安定に細胞外に分泌される事等があげられる。これらに対して*Aspergillus* 属のアミラーゼ遺伝子のプロモーターや*Trichoderma* 属のセルラーゼ遺伝子プロモーターなど、有効なプロモーターが開発されてきた。これまでの知見によれば、*Aspergillus oryzae*を宿主に、 α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターを用いて*Mucor miehei*のレンニンを培養液1Lあたり3.3g生産できるとされている。

しかしながら、いかに強力なプロモーターを利用しても、一般に、取得したい目的タンパク質は宿主のタンパク質生産量を越えることはない。実際、上述*Aspergillus oryzae*の例については30% のタンパク質生産能力が利用されているにすぎない。この現象については、利用した遺伝子が宿主に残っている、翻訳領域のコドン使用頻度が種により異なる、分泌のメカニズムが種により異なる等の事が考えられているが、これらを改良する技術はいまだ発見されていない。

そこで宿主のタンパク質生産量自体を向上させることにより、目的タンパク質の収得量を向上させることが考えられる。

これまで、*Trichoderma* 属に属する糸状菌は優れたセルラーゼ生産菌であることが知られている。特に*Trichoderma reesei*は異種タンパク質の生産に関しても各種検討されており、同菌の分泌タンパク質の約70% を占めるといわれているセロビオハイドロラーゼ1 (cbh1) 遺伝子のプロモーターを用いて、異種タンパク質発現の検討が多く行なわれている (Uusitalo JM, et. al.: J. Biotechnol. (1991), 17, 35. Joutsjoki VV, et. al.: Curr. Genet. (1993), 24, 223. Barnett CC, et. al.: Biotechnology (1991), 9, 562. Berges T, et. al.: Curr. Genet. (1993), 24, 53. Saloheimo M, et. al.: Gene (1989), 85, 343. Saarelainen R, et. al.: Mol. Gen. Genet. (1993), 241, 497.)。しかし、*Trichoderma viride*を宿主とした異種タンパク質発現系についてはC. Chengらの報告に見られるだけである。C. Chengらによれば、*Trichoderma viride*のプロテアーゼ欠損株を宿主にcbh1プロモーター、シグナル配列を用いた α -アミラーゼ遺伝子を導入し、培養液1Lあたり1gの α -アミラーゼが生産されたとしている。これは、*Trichoderma viride*を用いた異種タンパク質生産の可能性を示すものであるが、生産レベルは実生産スケールにおいてはコスト的に満足するものではない。

発 明 の 概 要

本発明者らは、今般、*Trichoderma viride*由来のセルラーゼ遺伝子の制御配列が目的タンパク質を高発現させるとの知見を得て、この制御配列を用いて*Humicola insolens* 由来のエンドグルカナーゼを15g/L 生産させることに成功した。このような生産量は、これまでに開示された如何なる糸状菌の異種タンパク質生産系においても確認されていない。本発明は、これら知見に基づくものである。

よって、本発明は、目的タンパク質を高発現させる制御配列およびそれを用いたタンパク質の大量生産系の提供をその目的としている。

また、本発明は、上記生産系を用いたタンパク質またはペプチドの大量生産法の提供をその目的としている。

そして、本発明による目的タンパク質を高発現させる制御配列は、*Trichoderma viride*由来のセルラーゼcbhl遺伝子の制御配列である。

また、本発明によるタンパク質の大量生産系は、この*Trichoderma viride*由来のセルラーゼcbhl遺伝子の制御配列を利用したものである。

図面の簡単な説明

図1は*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼcbhl遺伝子およびその制御配列を含むプラスミドpA01、ならびにその消化断片をクローン化したプラスミドpCB1-H3、pCB1-H4、pCB1-S1、pCB1-S3、pCB1-a1、pCB1-b1、pCB1-c2、pCB1-d1、およびpCB1-e1の制限酵素地図である。

図2はプラスミドpCB1-MXの制限酵素地図である。

図3はプラスミドpCB1-M2の制限酵素地図である。

図4はプラスミドpCB1-M2XRの制限酵素地図である。

図5はプラスミドpCB1-HEgXの制限酵素地図である。

図6は、プラスミドpCB1-Eg3Xの制限酵素地図である。

図7は、プラスミドpCB-XI⁺の制限酵素地図である。

発明の具体的説明

微生物の寄託

図2に記載の地図で表されるプラスミドpCB1-MXで形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-6044の受託番号のもと1996年9月9日（原寄託日）に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1-1-3、以下「NIBH」と略す）に寄託されている。

図4に記載の地図で表されるプラスミドpCB1-M2XRで形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-6045の受託番号のもと1996年9月9日

(原寄託日) に N I B H に寄託されている。

図 5 に記載の地図で表されるプラスミド pCB1-HEgX で形質転換された大腸菌 J M 1 0 9 株は、F E R M B P - 6 0 4 6 の受託番号のもと 1 9 9 6 年 9 月 9 日 (原寄託日) に N I B H に寄託されている。

図 6 に記載の地図で表されるプラスミド pCB1-Eg3X で形質転換された大腸菌は、F E R M B P - 6 0 4 3 の受託番号のもと 1 9 9 7 年 8 月 1 1 日に N I B H に寄託されている。

図 7 に記載の地図で表されるプラスミド pCB-XI で形質転換された大腸菌は、F E R M B P - 6 0 4 2 の受託番号のもと 1 9 9 7 年 8 月 1 1 日に N I B H に寄託されている。

本発明による cbh1 遺伝子およびその制御配列の由来となった *Trichoderma viride* MC300-1 株は、F E R M B P - 6 0 4 7 の受託番号のもと 1 9 9 6 年 9 月 9 日 (原寄託日) に N I B H に寄託されている。

定義

本明細書において、タンパク質およびペプチドは特に断らない限り、同義に用いることとする。また、本明細書において、改変配列とは、塩基配列またはアミノ酸配列において、幾つかの (例えば、1 ~ 数個の) 塩基またはアミノ酸の挿入、置換または欠失、もしくはその一方または両末端への付加がなされたものを意味する。

Trichoderma viride 由来のセルラーゼ cbh1 遺伝子の制御配列

本発明による制御配列は、*Trichoderma viride* 由来の制御配列である。本発明において制御配列とは、プロモーター、シグナル配列、およびターミネーターからなる群から選ばれる少なくとも一つを意味する。

本発明による制御配列とは、より具体的には、図 1 に記載のプラスミド pA01 内にある cbh1 遺伝子の制御配列である。

本発明において好ましいプロモータ配列の例としては、図1に記載のプラスミドpA01中の、cbh1遺伝子のアミノ末端から上流の約1.5kb までの領域中に存在する配列、例えばプラスミドpA01中のcbh1遺伝子のアミノ末端から上流のHindIII サイトまでの配列である。

さらに、本発明によるプロモーター配列には、この領域の全配列のみならず、高プロモーター活性を保持するその改変配列も含まれる。本発明において、高プロモーター活性とは、後記するセルラーゼNCE4 遺伝子の発現において、高発現を実現する強いプロモーター活性を意味し、より具体的には、培地1リットルあたり7〜8g、好ましくは15g以上のNCE4の発現を実現するプロモーター活性を意味するものとする。後記する実施例に記載の知見、寄託されている菌株、および配列番号1の配列が与えられた当業者であれば、そのような改変配列が存在することは容易に予測でき、また容易に製造することが可能であることは明らかである。

また、本発明において好ましいシグナル配列とは、配列番号1に記載のアミノ酸配列の-17から-1までの配列をコードする塩基配列が挙げられる。更に本発明には、その塩基配列の改変配列であって、シグナル配列活性を保持するアミノ酸配列をコードするものも包含される。このような改変配列についても、後記する実施例に記載の知見、寄託されている菌株、および配列番号1の配列が与えられた当業者であれば、そのような改変配列が存在することは容易に予測でき、また容易に製造することが可能であることは明らかである。

なお、これら配列の実際の利用にあたり上記のシグナル配列に加えてさらにcbh1タンパク質のN末端側のいくつかのアミノ酸が付加されてもよいことは当業者に明らかである。すなわち、これらシグナル配列の利用にあたり、目的タンパク質が、cbh1タンパク質のN末端側のいくつかのアミノ酸からなるペプチドとの融合タンパク質、さらにはcbh1タンパク質との融合タンパク質として得られてもよ

い。

さらに、本発明において好ましいターミネーター配列としては、プラスミド pA 01中のcbh1遺伝子のカルボキシル末端から下流の約 1kbまでの領域中に存在する配列、例えばcbh1遺伝子のカルボキシル末端から下流のSalIサイトまでの配列が挙げられる。

さらに、本発明によるターミネーター配列には、これら領域の全配列のみならず、そのターミネーター活性を保持する改変配列も含まれる。

これら制御配列、とりわけ前記プロモーター配列は、後記するセルラーゼ N C E 4 遺伝子を極めて高効率で発現させる。従って、本発明の好ましい態様によれば、N C E 4 遺伝子の発現に好ましく用いられる制御配列、とりわけ N C E 4 遺伝子の発現に好ましく用いられるプロモーター配列が提供される。本発明の好ましい態様によれば、セルラーゼ N C E 4 の生産量は培養液 1 リットルあたり 7 ～ 8 g、好ましくは約 15 g に達する。

発現ベクターおよび宿主

本発明によれば、上記制御配列を用いて目的タンパク質を発現するための発現ベクターが提供される。

本発明による発現ベクターは、その第一の態様によれば、上記制御配列と、場合によって遺伝子マーカーとを含んでなるものである。さらに、本発明による発現ベクターは、第一の態様の発現ベクターに、さらにその制御配列に作動可能に連結された目的タンパク質をコードする塩基配列を含んでなるものである。従って、上記した本発明によるプロモーター、シグナル配列、およびターミネーターからなる群から選ばれる少なくとも一つを含んでなる発現ベクターは本発明の範囲に包含されるものである。

前記したように、本発明によるプロモーター配列は極めて有用性の高いものであることから、本発明の好ましい態様によれば、本発明によるプロモーター配列

を少なくとも含んでなる発現ベクターが提供される。この発現ベクターにあって、シグナル配列、ターミネーター配列は本発明によるシグナル配列およびターミネーター配列以外のものであってもよいが、上記した本発明によるシグナル配列およびターミネーター配列の利用が好ましい。これらベクターの具体例としては、後記する実施例において構築された発現ベクターpCB1-MX、pCB1-M2XRが挙げられる。

本発明による発現ベクターは、発現ベクターを構築する為の宿主細胞において複製可能なベクター、例えばプラスミドを基本に構築されるのが好ましい。そのようなベクターとして、大腸菌で複製可能なベクターである、pUC Vector、pTV Vector、pBluescript、pBR322などが挙げられる。本発明によるベクターの構築に必要な手法は、遺伝子組み替えの分野において慣用されている方法を用いることができる。

また遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の手法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子等を利用することができる。本発明に用いることができる薬剤耐性遺伝子としては、宿主細胞が感受性を示す薬剤に関するものならば限定されないが、例えば、宿主として*Trichoderma viride*を用いる場合、*Streptomyces rimofaciens*由来のデストマイシン耐性遺伝子、*Escherichia coli*由来のハイグロマイシンB耐性遺伝子、*Streptococcus hindustanus*由来のプレオマイシン耐性遺伝子を好ましく用いることができる。

本発明の好ましい態様によれば、公知の方法により、*Aspergillus nidulans*由来trp C 遺伝子のプロモーターとターミネーター (Mullaney, E. J. et al., Mol. Gen. Genet. 199: 37-45, 1985) が得られ、これを用いて、ハイグロマイシンB耐性遺伝子を発現可能にしたカセット (Cullen, D. et al., Gene(1987), 57, 21) を利用するのが好ましい。

本発明による発現ベクターは、種々の目的タンパク質またはペプチドの発現生産に利用することができる。本発明において目的タンパク質またはペプチドとは、宿主細胞に存在しないいわゆる外来タンパク質のみならず、宿主細胞において発現してはいるがその量が微量であるタンパク質をも意味するものとする。本発明による発現ベクターにおける目的タンパク質をコードする遺伝子としては、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、フィターゼ等産業上有用なタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。また、これらを人為的に改良した遺伝子についても同様に目的タンパク質をコードする遺伝子とすることができる。

本発明による発現ベクターは、*Trichoderma viride*由来の *cbh1* 遺伝子が発現可能な宿主細胞ならば特に限定されないが、好ましくは、宿主として*Trichoderma* 属に属する微生物と組み合わされて発現系とされる。本発明の好ましい態様によれば、*Trichoderma* 属に属する微生物として*Trichoderma viride*を利用することができる。

更に本発明の好ましい態様によれば、最も好ましい宿主として*Trichoderma viride*高セルラーゼ生産株である*Trichoderma viride* MC300-1株を利用するのが好ましい。

また、本発明の好ましい態様によれば、宿主細胞として*Trichoderma reesei*を用いることも可能である。

更に本発明の好ましい態様によれば、本発明による発現系はセルラーゼの発現に極めて有利に利用することができる。セルラーゼの具体例としては、フミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼNCE 4またはその改変タンパク質、およびWO 91/17243号公報（特表平5-509223）に記載の43kDのエンドグルカナーゼ、*Trichoderma viride* 由来のエンドグルカナーゼSCE3またはその改変タンパク質、または同じく *Trichoderma viride* 由来のキシラナーゼSX Y1またはその改変タンパク質が挙げられる。ここで、フミコーラ・インソレンス

由来のセルラーゼNCE4とは、配列番号3に記載の1番から284番までの配列を有するタンパク質を意味する。また、エンドグルカナーゼSCE3とは、配列番号5に記載の1番から397番までの配列を有するタンパク質を意味する。さらに、*Trichoderma viride* 由来のキシラナーゼSXY1とは、配列番号7に記載の1番から190番までの配列を有するタンパク質を意味する。

なおここで、改変タンパク質とは、上記タンパク質のアミノ酸配列において、いくつかの（例えば、1～数個の）アミノ酸の付加、挿入、削除、欠失、または置換などの改変が生じたタンパク質であって、依然としてその酵素活性、とりわけエンドグルカナーゼ活性またはエンドキシラナーゼ活性を保持するものを意味するものとする。

本発明の好ましい態様によれば、セルラーゼNCE4の発現系として好ましいベクターの具体例としては、後記する実施例によって構築された発現ベクターpCB1-HEgXが挙げられる。また、エンドグルカナーゼSCE3またはキシラナーゼSXY1の発現系として好ましいベクターの具体例としては、後記する実施例によって構築された発現ベクターpCB1-Eg3X またはpCB-XI⁺が挙げられる。

目的タンパク質の生産

本発明による目的タンパク質の生産は、上記した本発明による発現ベクターで形質転換された宿主細胞を適当な培地中で培養し、培養物から目的タンパク質またはペプチドを採取することによって実施される。

本発明の好ましい態様によれば、極めて効率のよい目的タンパク質の生産系が提供される。例えば、宿主細胞が*Trichoderma viride*である場合、その培養液1リットルあたり7gまたは8g以上、好ましくは15g以上の目的タンパク質を生産することができる。この量は、従来知られたタンパク質の発現系と比較して、極めて多量である。このことは、本発明による目的タンパク質の発現系が極めて高い有用性を有していることを示している。

例えば、目的タンパク質がセルラーゼNCE 4である場合、これら酵素は本来的に高活性であるが、それを更に大量に生産することができる。その結果、セルロース含有繊維の毛羽除去、減量加工、およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工などに有用なセルラーゼ調製物を効率よく生産することが可能となる等の利点が得られる。

本発明による目的タンパク質の生産法において、形質転換体の培養は、慣用の成分、例えば炭素原、窒素原、無機塩、増殖因子成分などを含む培地で、好気的条件下での培養法、振盪培養法、電気攪拌培養法または深部培養法により行うことができる。培地のpHは例えば4～8程度である。培養は宿主細胞が*Trichoderma viride*である場合、*Trichoderma viride*の培養に慣用される通常の条件、例えば20℃～37℃、好ましくは26℃～28℃、培養時間は48～168時間程度の条件で行うことができる。

本発明によって得られるタンパク質あるいはペプチドの培養物からの回収にあたっては、その性状を利用した通常の分離手段、例えば溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマト法、ゲル濾過法、透析法、沈殿法等を単独で、または適宜組み合わせて用いることができる。

セルラーゼcbh1およびその遺伝子

本発明による制御配列の由来となったセルラーゼcbh1遺伝子は、配列番号1に記載される配列の一部または全部を有するものである。また、遺伝子工学の慣行法（例えば部位指定変異など）を用いて本遺伝子の各構成（プロモーター、シグナル配列、ターミネーターなど）や翻訳領域の各構成（コア部位、リンカー部位、基質結合部位）を付加、挿入、欠失または置換等の改変を行った配列番号1に記載される*Trichoderma viride*由来のcbh1断片、すなわちその改変配列も本発明に包含される。

配列番号1に記載される塩基配列は、*Trichoderma viride*の染色体由来cbh1遺

伝子の塩基配列を表したものである。配列番号1 に記載される塩基配列は、配列番号1438のATG で始まり、配列番号3109の終止コドン (TAA) で終了するオープンリーディングフレーム (読み取り枠) を有する。また、配列番号1489~3108の塩基配列は、497 残基からなる前記成熟cbh1タンパク質に対応する。更に、配列番号1 の塩基配列中には2 つのイントロンが存在することが確認された。

本発明によるcbh1遺伝子はこれまでにクローン化され塩基配列が明らかにされたいかなるセルラーゼ遺伝子のそれと同一のものは確認されない。すなわち、DNA データベースGenBank R96, August, 1996 、に登録されているセルラーゼ遺伝子と比較することによってすでに確認されている。

更に、配列番号2 に示すcbh1タンパク質は、これまでにクローン化され塩基配列が明らかにされたいかなるセルラーゼ遺伝子のそれと同一のものは確認されない。すなわち、アミノ酸データベースProtein Identification Resource R48 March, 1996 、SWISS-PROT R33 February, 1996 に登録されているセルラーゼタンパク質と比較することによってすでに確認されている。

タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするDNA 配列は容易に定まり、配列番号1 に記載されるDNA 配列の全部または一部をコードする種々の塩基配列を選択することができる。従って、本発明による配列番号1 に記載されるDNA 配列の一部または全部をコードする配列とは、配列番号2 に記載される一部または全部のアミノ酸配列に加え、同一のアミノ酸をコードする配列であって縮重関係にあるコドン塩基配列として有する配列も意味するものとする。

本発明によるDNA は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよい。また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。DNA の典型的な取得方法としてはTrichoderma viride由来の染色体ライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列の情報を基にして作成した適当なDNA プローブを用いてスクリーニングを行う方法、が挙

げられる。また寄託菌より得ることも可能である。

なお、本発明によるcbh1遺伝子の配列は、*Trichoderma viride*と*Trichoderma reesei*の菌株の差異を明確に示している。すなわち、cbh1翻訳領域のDNA配列の相同性は約96%であるものの、非翻訳領域（イントロン）の相同性は66%、さらに、プロモーター、ターミネーターのDNA配列は翻訳領域からそれぞれ150bp、170bp以上離れた場合相同性は見受けられない。これは、cbh1遺伝子の起源は同一であっても、それを受け継いだ各菌株の遺伝的多様性が非常に離れていることを示している。

これまでは、糸状菌の分類は形態学的特徴からなされることが一般的であるが、近年多用されるDNA分析によれば、菌株間の差異は明確である。たとえば、*Trichoderma reesei*と*Trichoderma longibrachiatum*のセロビオヒドロラーゼ（cbh）2遺伝子のサザン解析からハイブリダイゼーションパターンの差異を示した（Meyer W, et. al.: Curr. Genet. (1992), 21, 27. Morawez R, et. al.: Curr. Genet. (1992), 21, 31）。

実施例

実施例1：cbh1遺伝子のクローン化

(1a) cbh1タンパク質の精製

Trichoderma viride MC300-1 株をP培地（1.0%グルコース、4.0%ラクトース、2.0%大豆粕、1.0%イーストエキス、0.5%リン酸カリウム、0.2%硫酸アンモニウム、0.2%炭酸カルシウム、0.03%硫酸マグネシウム）で5日間、28℃で培養した。本培養液を遠心分離して菌体残渣を除去し、培養上澄をファルマシアバイオテク社製FPLC装置（RESOURCE Q 50mM トリス-塩酸（pH7.8）.0—1M 塩化ナトリウムグラディエント）を用いて分画し、塩化ナトリウム濃度約280mMで溶出されるピークを分取した。この画分をSDS-PAGE（テフコ社製 SDS-PAGE mini、8% gel）に供したところ、クマジーブリリアントブルーR250染色において分子量約67キロ

ダルトン (kDa) のcbh1がほぼ単一バンドとして得られた。

(1b) cbh1タンパク質のアミノ酸配列解析

アミノ末端のアミノ酸配列の解析はPodell, D. N. らの方法 (Podell, D. N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1978) 81:176) に従い修飾アミノ末端残基を除去した。即ち、上述のように精製したcbh1画分を脱塩濃縮し、約0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に調整した。これを5mM ジチオスレイトール、10mM EDTA、5%グリセロール、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 8.0) 中ペーリンガーマンハイム社製ピログルタメートアミノペプチダーゼ (シーケンスグレード) を用い、50°C、6 時間反応させ、修飾アミノ末端残基を除去した。これをSDS-PAGEに供し、PVDF膜 (ミリポア社製イモビロン-PSQ) にブロット後、水洗して風乾した。

本ブロットはパーキンエルマー社製プロテインシーケンサーModel 492 を用いてアミノ酸配列を解析した。その結果、以下のアミノ末端のアミノ酸配列 (10残基) を解読した。

アミノ末端アミノ酸配列 : Ser-Ala-Xaa-Thr-Leu-Gln-Ala-Glu-Thr-His (配列番号9)

(1c) ペプチドマップ

前記 (1a) のように精製したcbh1画分を100mM 重炭酸アンモニウム (pH 7.8) 溶液中1/50モル量のV8プロテアーゼ (シグマ社製) で消化し、パーキンエルマー社製Model 172 μ プレパラティブHPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い (カラム : RP-300アクアポア C8、220 \times 2.1mm、0.1% トリフルオロ酢酸-0.085% トリフルオロ酢酸/35% アセトニトリルグラディエント)、二種のペプチドを分取し、V8-33 およびV8-34 と名付けた。

これらのアミノ酸配列を解析したところ、以下のような配列であった。

V8-33 : Glu-Phe-Ser-Phe-Asp-Val (配列番号10)

V8-34 : Glu-Thr-His-Pro-Pro-Leu-Thr-Trp-Gln-Lys-Xaa-Ser-Ser-Gly-Gly

-Thr-Xaa-Thr (配列番号 11)

これらのアミノ酸配列は、*Trichoderma reesei*株から得られたcbh-1タンパク質のアミノ酸配列 (S. Shoemaker et al., Bio/Technology (1983), 1:691) と相同性を示した。更に*Trichoderma viride*株から得られたエキソセロビオハイドロラーゼ (Cheng Cheng et. al., Nucleic Acids Res., (1990) 18, 5559) と同一のアミノ酸配列を示すことから、同タンパク質をコードする遺伝子のクローニングは*Trichoderma viride*株由来のエキソセロビオハイドロラーゼ遺伝子の翻訳領域をPCRを用いて増幅し、これをプローブとして用いた。

(1d) cbh1翻訳領域の増幅

cbh1翻訳領域は*Trichoderma viride* MC300-1株由来ゲノムDNAを鋳型にPCRにより増幅した。

ゲノムDNAの単離はHoriuchiらの方法 (Hiroyuki Horiuchi et al., J. Bacteriol (1988) 170, 272-278) に従った。まず、*Trichoderma viride* MC300-1株をS培地 (3.0%グルコース、0.1%ポリペプトン、1%イーストエキス、0.14%硫酸アンモニウム、0.2%リン酸カリウム、0.03%硫酸マグネシウム、pH 6.8) で24時間培養し、遠心分離 (3500rpm, 10分) によって菌体を回収した。得られた菌体を凍結乾燥後、TE (10mMトリスー塩酸、1mM EDTA) 緩衝液に懸濁し、3%SDS溶液中、60℃、30分間処理後、TE飽和フェノール抽出により、菌体残渣を除去した。抽出液はエタノール沈澱化後、リボヌクレアーゼA (シグマ社製) 及びプロテイナーゼK (和光純薬社製) 処理し、さらに日立工機社製65P-7超遠心機で塩化セシウム密度勾配沈降平衡法によりDNAを得た。

PCRは宝酒造社製Takara Taqを用いた。プライマーとして以下に示すcbh1-Nとcbh1-Cを用い、94℃1分間、50℃2分間、72℃3分間のサイクルを40回繰り返すことにより反応を行った。その結果、約1.7kbpのDNAが増幅された。

以下にcbh1-Nとcbh1-Cの配列を示す。

cbh1-N: 5'-ATG TAT CAA AAG TTG GCC-3' (配列番号12)

cbh1-C: 5'-TTA CAA GCA CTG AGA GTA G-3' (配列番号13)

このPCR 増幅断片はアガロース電気泳動の後、ファルマシア社製バンドプレップキットに従いアガロースから回収し、これをスクリーニング用プローブとした。

実施例2 : *Trichoderma viride* ゲノムDNA ライブラリーの作製

Trichoderma viride MC300-1 株ゲノムDNA をSau3AIにより部分消化した。これをファージベクター、 λ EMBL3 クローニングキット (ストラタジーン社製) のBamHI アームにT4リガーゼ (宝酒造社製ライゲーションキットVer.2) を用いて連結させた。これをエタノール沈澱後、TE緩衝液に溶解した。連結混合物の全量をストラタジーン社製ギガパックIIパッケージングキットに従い、ファージ粒子を形成させた。このファージは大腸菌LE392 株に感染させた。この方法により得られた 1.1×10^4 個のファージライブラリーを用いて目的遺伝子のクローニングを行った。

実施例3 : cbh1遺伝子のサブクローニング

(3a) プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニング

Trichoderma viride 株由来のエキソセロビオハイドロラーゼ遺伝子の翻訳領域約1.7kb のDNA 断片を、あらかじめアマシャム社製ECL ダイレクトシステムに従い、標識化した。

実施例2 において作成したファージプラークを、ハイボンドN⁺ ナイロントランスファーマンブラン (アマシャム社製) に転写し、アルカリ変性後、5 倍濃度SSC (SSC: 15mM クエン酸3ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、乾燥させDNA を固定した。キットの方法に従って、1 時間のプレハイブリダイゼーション (42°C) の後、先の標識化したプローブを添加し、4 時間 (42°C) ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は前述キットの方法に従った。

プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、添付されている検出溶液に1 分間浸し

たあと、同社製ハイパーフィルムECL に感光させ、4 個の陽性クローンを得た。

(3b) ファージDNA の調製

陽性クローンからのDNA 調製はManiatisらの方法 (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

宿主大腸菌はLE392 を用いた。まず、LE392 をLB-MM 培地 (1 %ペプトン、0.5 %イーストエキス、0.5 % 塩化ナトリウム、10mM硫酸マグネシウム、0.2%マルトース) で一晩培養し、これにシングルプラーク由来のファージ溶液を感染させ、LB-MM 培地で一晩培養した。これに、塩化ナトリウムを1M、クロロホルムを0.8%になるよう加え、大腸菌の溶菌を促進させた。遠心分離により、菌体残渣をのぞき、ポリエチレングリコール (PEG) 沈澱 (10%PEG6000) からファージ粒子を回収した。ファージ粒子はSDS 存在下、プロティナーゼK で消化し、これをフェノール処理、エタノール沈澱化して、ファージDNA を回収した。

以上のように回収したDNA はアマシャム社製ECL ダイレクトシステムに従い、サザンブロット解析を行った。実施例1 のPCR 増幅断片をプローブにハイブリダイゼーションを行った結果、7kbpのPstI消化断片が共通にハイブリダイズした (図1) 。

この共通にハイブリダイズするPstI断片をpUC118 (宝酒造社製) にサブクローンし、プラスミドpA01を得た。

実施例4 : cbh1遺伝子の塩基配列の決定

(4a) ゲノムDNA の塩基配列解析

塩基配列決定は以下の様に行った。塩基配列解析装置は、ファルマシアバイオテク社製A. L. F. DNAシーケンサーIIを用いた。シーケンシングゲルとして、FMC社製ハイドロリンクロングレンジャーとして市販されているアクリルアミド担体を使用した。ゲル作成用各種試薬 (N, N, N', N'- テトラメチルエチレンジアミ

ン、尿素、過硫酸アンモニウム）はファルマシアバイオテック社製A.L.F グレードの試薬を用いた。

塩基配列解読反応は、ファルマシアバイオテック社製オートリードシーケンシングキットを用いて行った。ゲル作成条件、反応条件、および泳動条件の各々は、各説明書の詳細を参照し、設定した。

また、塩基配列解読用鋳型プラスミド（以降テンプレートと記す）は、以下のような一本鎖DNA と分断クローンを調製し、テンプレートとした。

まず、pA01をHindIII で消化し、3.1kb の断片をpUC119にクローン化したもの（pCB1-H3 またはpCB1-H4 ）、またはSalIで消化し、2.8kb の断片をpUC119にクローン化したもの（pCB1-S1 またはpCB1-S3 ）をM13 一本鎖DNA として調製し、用いた。更に、3.1kb のHindIII 断片をpUC18 にクローン化し（pCB1-2、pCB1-7）、pCB1-7をEcoRI で消化し、4kb の消化断片を自己閉環したもの（pCB1-b1 ）、1.3kb の消化断片をpUC118にクローン化したもの（pCB1-a1 ）、pCB1-7をSalIで消化し、5.4kb の断片を自己閉環したもの（pCB1-c2 ）、pCB1-2をHindIII およびEcoRV で消化し、2.2kb と0.9kb の断片をそれぞれpUC18 のHindIII-HincIIサイトに連結し、クローン化したもの（pCB1-e1 、pCB1-d1 ）の全9 種類のプラスミドを調製した（図1 ）。

（4b） 一本鎖DNA の調製

pCB1-H3 、pCB1-H4 、pCB1-S1 、pCB1-S3 の各プラスミドを大腸菌JM109 に形質転換し、形質転換されたコロニーを150 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地で一晩前培養した。この培養液に対して 10^9 PFU/mlのヘルパーファージM13K07懸濁液を等量感染させた。これを100 倍量の150 μ g/mlのアンピシリンおよび70 μ g/mlのカナマイシンを含むLB培地中で一晩本培養した。

この培養液30mlを遠心分離（8000rpm 、10分間）して菌体を除去し、培養上澄に対して6ml のPEG-NaCl（20%PEG6000、2.5M塩化ナトリウム）を加えM13 粒子を

沈澱化した。M13 のPEG 沈澱は3ml の100mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、10mM塩化マグネシウム溶液に懸濁し、100 μ g/mlのDNaseI (ベーリンガーマンハイム社製)、10 μ g/mlのリボヌクレアーゼA 処理により、夾雑する大腸菌の核酸を分解した。これをさらにPEG 沈澱化し、TE緩衝液に懸濁後TE飽和フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出の後、エタノールにより一本鎖DNA を沈澱化した。

(4c) シーケンス反応および解析

まず、二本鎖プラスミドを2M水酸化ナトリウムでアルカリ変性した後、pCB1-2とキットに添付のUniversal 及びReverse ; pCB1-7とUniversal 及びReverse ; pCB1-a1 とUniversal 及びReverse ; pCB1-b1 とReverse ; pCB1-c2 とReverse ; pCB1-d1 とReverse ; pCB1-e1 とReverse のプライマーの各組み合わせによりアニリングさせ、キットに従い伸長反応を行った。更に、pCB1-2とWVCI-01、WVCI-02、WVCI-03、WVCI-04 及びWVCI-06 の組み合わせでシーケンス反応を行い、cbh1翻訳領域の塩基配列を決定した。

次に、pCB1-H3 の一本鎖DNA とUniversal、WVCI-07、WVCI-08、WVCI-09 及びWVCB-11 ; pCB1-H4 とWVCI-05、WVCI-15、WVCI-16 及びWVCI-17 ; pCB1-S1 とUniversal、WVCI-13、WVCI-14、及びWVCB-12 ; pCB1-S3 とWVCI-06、WVCI-10、WVCI-11、及びWVCI-12 の組み合わせでシーケンス反応を行いcbh1遺伝子のHindIII ~SalI断片の全長4176bpを配列表1 の様に決定した。

cbh1特異的シーケンスプライマーの配列は以下に示される通りであった。

WVCI-01: 5'-TCA CTT TCC AGC AGC CCA ACG CC-3' (配列番号14)

WVCI-02: 5'-CAA CTC TCC CAA CGC CAA GGT CG-3' (配列番号15)

WVCI-03: 5'-CGT CGG GTA GGT AGA GTC CAG CC-3' (配列番号16)

WVCI-04: 5'-TCT CGA ACT GAG TGA CGA CGG TC-3' (配列番号17)

WVCI-05: 5'-CTG CCA TGT CAG AGG CGG GTG AG-3' (配列番号18)

WVCI-06: 5'-ACT CCA ACA TCA AGT TCG GCC CC-3' (配列番号19)

WVCI-07: 5'-AAC TCC CAC TGA GCC TTT ACG TC-3' (配列番号20)
WVCI-08: 5'-CAA TTA AGT GGC TAA ACG TAC CG-3' (配列番号21)
WVCI-09: 5'-GCA AAA ATA TAG TCG AAT CTG CC-3' (配列番号22)
WVCI-10: 5'-GCT GGA ATG CTC GCT AGC TTG GC-3' (配列番号23)
WVCI-11: 5'-ACT GTT GGA GAC CAG CTT GTC CG-3' (配列番号24)
WVCI-12: 5'-CGC AGT AGG AGA ATA GAA ACC CC-3' (配列番号25)
WVCI-13: 5'-CTG CTG TCA ATC CCC GCT ACT GG-3' (配列番号26)
WVCI-14: 5'-CCT TCG AGA AAA GGA GAT TCG CG-3' (配列番号27)
WVCI-15: 5'-CAG CTC CTT GGC AAA AGC AGT GG-3' (配列番号28)
WVCI-16: 5'-AGA TCA TCA GTT GAG GTT AGA CC-3' (配列番号29)
WVCI-17: 5'-TGT ATA AAA TTA GGT TCG GGT CC-3' (配列番号30)
WVCB-11: 5'-CTA CTC ATC AAC TCA GAT CCT CC-3' (配列番号31)
WVCB-12: 5'-GGA AGC CTC AGA AGT AGA TAC AGC-3' (配列番号32)

(4d) 非翻訳領域 (以降「イントロン」と記す) の決定

イントロンの決定には、*Trichoderma viride* MC300-1 株からmRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成し、これとゲノムの塩基配列を比較し、同領域を判定した。

(4d-1) 全RNA の調製

Trichoderma viride MC300-1 株をP 培地で2 日間培養し、菌体を遠心分離 (3500rpm, 10 分) により回収した。この菌体を滅菌水で洗浄し、液体窒素で凍結したままブレンダーで粉砕した。これを4Mグアニジンチオシアン酸塩を含む変性溶液 (4Mグアニジンチオシアン酸塩、25mMクエン酸3 ナトリウム、0.5%N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、0.1Mメルカプトエタノール) に懸濁した。室温で数分間攪拌の後、2M酢酸ナトリウム (pH4.5) で中和し、TE飽和フェノールを加えさらに攪拌した。ここにクロロホルムーイソアミルアルコール (24:1) を加

え、攪拌の後、遠心分離（3500rpm, 10分）によりフェノールで変性した菌体成分を除去した。上層（水層）を回収し、イソプロパノールで核酸を沈殿化した。同沈殿を遠心分離（3500rpm, 10分）で回収し、70% エタノール-水で再遠心分離により沈殿を洗浄した。

同沈殿は、1mg/mlの核酸濃度になるようTE緩衝液に溶解の後、2.5M塩化リチウムで沈殿化（5℃で2時間）した。これを遠心分離（12000rpm, 10分）により沈殿を回収し、70% エタノールで洗い、これを全RNA画分とした。

（4d-2） ポリA テイル⁺RNA（=mRNA）の調製

mRNAの調製はファルマシアバイオテック社製mRNAピュアリフィケーションキットを用いた。

まず上記（4d-1）において調製した全RNAのうち、1mgを1mlのエリュージョンバッファーに溶解し、これに65℃、10分間の熱変性処理を加え、氷中で急冷の後、0.2mlのサンプルバッファーを加えた。この全量のRNA溶液をオリゴ（dT）セルロースカラムにチャージし、ハイソルトバッファーで3回、ロウソルトバッファーで3回カラムを洗浄の後、65℃に加温したエリュージョンバッファーで溶出した。このカラム操作を2回繰り返し、mRNA画分とした。

（4d-3） cDNAの合成

cDNA合成はファルマシアバイオテック社製タイムセーバーcDNA合成キットを使用した。

まず、5 μgのmRNAを20 μlのサンプルバッファーに溶解した。65℃、10分間の熱処理後、ファーストストランド合成ミックスにジチオスレイトール溶液、オリゴ（dT）プライマーと共に添加し、37℃1時間反応させた。次に、この全量をセカンドストランドミックスに加え、12℃、30分間、次いで22℃、1時間反応させ、これをcDNAとした。

（4d-4） cbh1cDNAの増幅

cbh1cDNAは全cDNAを鋳型にPCRにより増幅した。

PCRは宝酒造社製LA PCRキットを用いた。プライマーはMcbh1-NとMcbh1-Cを用い、94°C1分間、55°C2分間、72°C2分間のサイクルを25回繰り返すことにより反応を行った。その結果、約1.6kbpのDNAが増幅された。

Mcbh1-N およびMcbh1-Cの配列は以下に示される通りであった。

Mcbh1-N: 5'-TCG ACT ACG GAC TGC GCA TC-3' (配列番号33)

Mcbh1-C: 5'-CAA GCT TTT GCC ACA GTA CC-3' (配列番号34)

このPCR増幅断片はアガロース電気泳動の後、ファルマシア社製バンドブレップキットに従いアガロースから回収し、ノバジェン社製pT7-Blueにクローン化し(pCbhU)、これをイントロン決定用テンプレートとした。

(4d-5) cDNAの塩基配列解析

シーケンシング反応は前述同様オートリードシーケンシングキットを用いた。まず、プラスミドpCbhUを2M水酸化ナトリウムでアルカリ変性し、これをテンプレートとしてT7ポリメラーゼで反応させた。プライマーはキット添付のUniversalとReverse、更に前述WVCI-03とWVCI-04を用いた。

その結果、1899～1965bp (Introne I)、2663～2724bp (Introne II)の計2つのイントロンが存在した。配列表1において、非翻訳開始配列およびその終了配列、イントロン内部の調整配列は以下に示される通りであった。

Introne I : 1899 ～1904、1963～1965、1946～1952

Introne II: 2663 ～2668、2722～2724、2705～2711

実施例5 : *Trichoderma viride*用異種タンパク質発現分泌ベクターの構築

cbh1プロモーター、ターミネーター、分泌シグナルを目的タンパク質発現分泌に利用できる形にするため部位指定変異処理を行った。

(5a) 発現ベクターpCB1-MXの構築

部位指定変異処理はアマシャム社製スカルプターインビトロミュータジェネシ

システムを用いた。変異点はスタートコドンの上流と終止コドンの下流に導入した。

まず、変異導入用オリゴヌクレオチドCBn-Stu、CBc-Xhoを $0.90D_{260}/ml$ の濃度で100mM トリス塩酸 (pH 8.0)、10mM塩化マグネシウム、7mM ジチオスレイトール、1mM ATP 中PNK (東洋紡績社製)を用いて37°Cで15分間反応させ末端をリン酸化した。更に70°Cで10分間の熱処理で酵素を失活させた。

前述pCB1-H4、pCB1-S1の一本鎖DNA2 μ gに対してそれぞれCBn-Stu、CBc-Xhoを70°Cで3分間、次に55°Cの湯約500ml中で室温になるまで(約2時間)放置し、オリゴヌクレオチドをアニールさせた。

このアニールミックスにklenowフラグメント、T4リガーゼを反応させ、ヘテロ二本鎖を合成させた。このヘテロ二本鎖はT5エクソヌクラーゼで未反応の一本鎖を分解させた。次に制限酵素NciIでニックを入れ、エクソヌクラーゼIIIでテンプレートストランドを分解した。更に、変異ストランドをDNAポリメラーゼI、T4リガーゼを用いて二本鎖とし、これを大腸菌TG1に形質転換した。

変異DNAの検出は、pCB1-H4由来の変異はStuIで切断されるもの(pCB1H4-19)、pCB1-S1由来の変異はXhoIで切断されるもの(pCB1S1-17)を選抜した。次にpCB1H4-19をXbaIおよびXhoIで消化し、約6kbの断片を回収し、これとpCB1S1-17をXbaIで消化後、XhoIで部分的に切断した約1.2kbの断片を連結し、これをpCB1-Mとした。これをXbaIで消化し、PDH25 (Cullen, D., Leong, S.A., Wilson, L.J. and Henner, D.J., Gene 57, 21-26, 1987) 由来ハイグロマイシンB耐性カセットを挿入しpCB1-MXを構築した(図2)。

CBn-Stu、CBc-Xhoの配列は以下に示される通りであった。

CBn-Stu: 5'-GAT ACA TGA TGC GCA GGC CTT AGT CGA CTA GAA TGC-3' (配列番号 35)

CBc-Xho: 5'-GAT CCT CAA GCT TTT GCT CGA GTA CCT TAC AAG CAC-3' (配列番号

36)

(5b) 分泌ベクターpCB1-M2XR の構築

前述pCB1-MをSalIで消化し、約2.7kbの断片をpUC119にクローン化した(pCB1-SalM)。これを更に一本鎖化し、スカルプターインビトロミュータジェネシスシステムを用いて前記(5a)と同様に変異処理を行った。変異点はプロセス残基の上流と下流(CB1-SmSph)、cbh1タンパク質のリンカー構造中(CB1-Bam)、更に終止コドンの上流部(CB1-Pst)に導入した。

一方、変異遺伝子の構築は、pUC118をXbaIおよびEcoRIで切断し、これを宝酒造社製DNAブランチングキットを用いて末端を平滑化した。これを自己閉環し(pUC118-SBN)、SalIおよびHindIIIで消化後、cbh1プロモーターHindIII～SalI断片を連結した。このSalI部位に、変異が導入されたcbh1翻訳領域～ターミナーターを正しい向きで連結し、pCB1-M2を構築した(図3)。pCB1-M2XRはpCB1-M2のXbaI部位に前述ハイグロマイシンB耐性カセットを連結したものである(図4)。

CB1-SmSph、CB1-Bam、CB1-Pstの配列以下に示される通りであった。

CB1-SmSph: 5'-GGA GGG TGC ATG CCG ACT GAG CCC GGG CAG TAG CC-3' (配列番号37)

CB1-Bam: 5'-GCC GGG AGA GGA TCC AGT GGA GG-3' (配列番号38)

CB1-Pst: 5'-GCT CGA GTA CCT TAC TGC AGG CAC TGA GAG-3' (配列番号39)

実施例6: Trichoderma viride用NCE4分泌ベクターの構築

Trichoderma virideにNCE4を強制分泌させるために、Humicola insolens由来NCE4翻訳領域をPCRにより増幅した。

まず、Horiuchiらの方法(Hiroyuki Horiuchi et al., J. Bacteriol., 170:272-278, 1988)に従い、Humicola insolensの全DNAを回収した。具体的には、フミコーラ・インソレンスHN200-1を(N)培地(5.0%アビセル、2.0%酵母エキ

ス、0.1%ポリペプトン、0.03% 塩化カルシウム、0.03% 硫酸マグネシウム、pH6.8) 中、37°Cで培養した。2日間培養の後、遠心分離(3500rpm、10分)によって菌体を回収した。得られた菌体をフェノール処理、プロテインナーゼK、およびリボヌクレアーゼA処理、さらにポリエチレングリコール(PEG)沈殿化によりゲノムDNAを得た。

得られた全DNAを鋳型として、HEg-mn(Sph)とHEg-c(Sal)の各プライマー1 μ M、dNTPs200 μ M存在下Pfuポリメラーゼ(ストラタジーン社製)を用いてPCRを行った。PCR反応のサイクルは94°Cで1分間の熱変性の後、55°Cで2分間アニーリング、75°Cで5分間伸張反応を25回行い、目的のDNA断片を増幅させた。

PCR増幅断片はファルマシアバイオテック社製マイクロスピンス-400HRカラムに供し、残存するプライマー等を除去した。更に、SphI及びSalIで消化し、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.9kbの断片を回収した。

一方pCB1-M2をSphIおよびXhoIで消化し、7.3kbの断片を回収した。これに0.9kbの消化PCR断片を連結し、更にXbaI部位に前述ハイグロマイシンB耐性カセットを挿入し、構築されたベクターをpCB1-HEgX(図5)とした。

なお、上記操作によって得られたNCE4の翻訳領域の塩基配列は配列番号4に記載されるとおりであった。

HEg-mn(Sph)とHEg-c(Sal)の配列は以下に示される通りであった。

HEg-mn(Sph):5'-GGG GCA TGC GCT GAT GGC AAG TCC ACC CG-3' (配列番号40)

HEg-c(Sal):5'-GGG GTC GAC TAC CTT ACA GGC ACT GAT GGT ACC-3' (配列番号41)

実施例7: *Trichoderma viride*の形質転換

Trichoderma viride MC300-1をS培地中28°Cで培養し、24時間後、3000rpm、10分間遠心分離により集菌した。得られた菌体を0.5 Mシュウクロースで洗浄し、0.45 μ mのフィルターで濾過したプロトプラスト化酵素溶液(5mg/ml ノボザイ

ム234、5mg/mlセルラーゼオノズカR-10、0.5M シュークロース)に懸濁した。30℃で60～90分間振盪し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過した後、2500rpm、10分間遠心分離してプロトプラストを回収し、SUTC (0.5M シュークロース、10mM 塩化カルシウム、10mM トリスー塩酸 (pH7.5)) 緩衝液で洗浄した。

以上のように調製したプロトプラストを1ml のSUTC緩衝液に懸濁し、この100 μ l に対し10 μ g のDNA (TE) 溶液 (10 μ l) を加え氷中に5 分間静置した。つぎに、400 μ l のPEG 溶液 (60% PEG4000、10mM 塩化カルシウム、10mM トリスー塩酸 (pH7.5)) を加え、氷中に20分間静置した後、10mlのSUTC緩衝液を加え、2500rpm、10分間遠心分離した。集めたプロトプラストを1ml のSUTC緩衝液に懸濁した後、4000rpm で5 分間遠心分離して、最終的に100 μ l のSUTC緩衝液に懸濁した。

以上の処理をしたプロトプラストを、ハイグロマイシンB (20 μ g/ml) 添加ポテトデキストロース (PD) 寒天培地 (3.9%ポテトデキストロースアガー、17.1% シュークロース) 上に、PD軟寒天 (1.3%ポテトデキストロースアガー、17.1% シュークロース) とともに重層し、28℃、5 日間培養後、形成したコロニーを形質転換体とした。

実施例 8 : pCB1-HEgX 形質転換体のNCE4生産性評価

実施例7 の様にプラスミドpCB1-HEgX を *Trichoderma viride* MC300-1 株に導入し、ハイグロマイシンB に耐性を示す株が1 μ g のDNA 当り約25株出現した。

この25株をS 培地で前培養後、前述P 培地で本培養した。この培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、NCE4タンパク質と予想される分子量約43kDのバンドが新たに観測された株が出現した。

その内NCE4生産性が高くと予測される株の培養上澄をFPLCシステム (ファルマシアバイオテック社製) により分画し、NCE4生産量を測定した。カラム

はRESOURCE RPC 3mlを用い、0.1%トリフルオロ酢酸を含む5—60% アセトニトリル濃度グラジェントで溶出し、約47% アセトニトリル濃度で溶出されるピークを分取し、脱塩、凍結乾燥後収得量を測定したところ、培養液1Lあたり、15g のNC E4が含まれていることが判明した。

実施例 9 : SCE3の単離精製

Trichoderma viride MC300-1株をP 培地で培養し、その培養上澄を疎水クロマトグラフィー (Phenyl-Sepharose HP 16/100、ファルマシアバイオテク社製) に供し、50mM酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中、1—0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、分画した。このうち、0.1—0Mの濃度勾配のときに得られた画分にジーンズ脱色活性が強く認められたので、その画分を疎水クロマトグラフィー (Resource PHE 30mm I.D. x150mm、ファルマシアバイオテク社製) に供し、50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中1—0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、活性画分を分取した。

このうち、0Mの濃度勾配のときに得られた画分にジーンズ脱色活性が強く認められた。その画分を疎水クロマトグラフィー (Butyl-Toyopearl 6500S 22mm I.D. x200mm、東ソー社製) に供し、50mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) で溶出し、ジーンズ脱色活性の強い画分を精製酵素SCE3として単離した。このSCE3はSDS-PAGEにおいて約50kDの単一なバンドを示した。

実施例 10 : SCE3遺伝子のクローニング

(10a) SCE3タンパク質のアミノ末端側アミノ酸配列解析

実施例 9 と同様にして得た精製SCE3をSDS-PAGEに供し、ミリポア社製PVDF膜 (Immobilon-PSQ) に転写した。このPVDF膜はクマシーブリリアントブルーで染色し、目的のタンパク質が転写された部分を切り取った。これを0.5 %ポリビニルピロリドン40、100mM 酢酸で37℃、30分間処理の後洗浄し、宝酒造社製Pfu ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ (50℃、5 時間) でアミノ末端修飾残基を除

去した。これをModel 492 アミノ酸シーケンサーに供し、アミノ末端側10残基のアミノ酸配列を解読した。その配列は以下に示される通りであった。

SCE3-N: Gln-Asp-Val-Trp-Gly-Gln-Cys-Gly-Gly-Ile (配列番号42)

(10b) ペプチドマップ

実施例9と同様にして得た精製SCE3画分を、50mM重炭酸アンモニウム (pH 7.8) 溶液中1/50モル量のV8プロテアーゼ (シグマ社製) で消化し、実施例1cと同様の手法を用いてV8-18.5、V8-26、およびV8-42の3種のペプチドを分取した。これらのアミノ酸配列を解析したところ、以下のような配列であった。

V8-18.5 : Thr-Pro-Thr-Gly-Ser-Gly-Asn-Ser-Trp-Thr-Asp (配列番号43)

V8-26 : Ser-Thr-Tyr-Ile-Leu-Thr-Glu (配列番号44)

V8-42 : Phe-Ala-Gly-Val-Asn-Ile-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Gly-Xaa-Thr-Thr (配列番号45)

これらのアミノ酸配列は、*Trichoderma reesei*株から得られたエンドグルカナーゼIII (EGIII) タンパク質のアミノ酸配列 (M. Saloheimo et. al., Gene (1988), 63, 11) と相同性を示したことから、同タンパク質をコードする遺伝子のクローニングは*Trichoderma reesei*株由来のEGIII 遺伝子の翻訳領域をPCRを用いて増幅し、これをプローブとして用いた。

(10c) SCE3翻訳領域の増幅

SCE3翻訳領域は*Trichoderma viride* MC300-1株由来ゲノムDNA を鋳型にPCRにより増幅した。

増幅は、実施例1dの*Trichoderma viride* MC300-1株由来染色体DNA を鋳型にTakara Taqを用いて行った。プライマーとしてSCE3-NとSCE3-Cを用い、94°C1分間、50°C2分間、および72°C3分間のサイクルを20回繰り返すことにより反応を行った。その結果、約1.5kbpのDNAが増幅された。

SCE3-NおよびSCE3-Cの配列は以下に示される通りであった。

SCE3-N: 5'-ATG AAC AAG TCC GTG GCT C-3' (配列番号 46)

SCE3-C: 5'-TTA CTT TCT TGC GAG ACA CGA GC-3' (配列番号 47)

このPCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動の後、ゲルから回収し、これをSCE3クローニング用プローブとした。

(10d) *Trichoderma viride*株由来SCE3遺伝子のクローン化

実施例2と同様の手法を用いて作製した 1.0×10^4 個のファージライブラリーを用いてSCE3遺伝子のクローニングを行った。ブランクハイブリダイゼーションの結果、1種の陽性クローンが得られた。このクローンはサザン解析の結果、約4kbのBamHI断片、約4kbのEcoRI断片、および約3.7kbのXbaI断片が染色体DNAと共通のハイブリダイゼーションパターンを示した。このXbaI断片をpUC118にクローン化(pUC-Eg3X)した。

実施例 11 : SCE3発現ベクターpCB1-Eg3X の構築

SCE3をcbh1プロモーターの制御下、大量に発現させるために、SCE3の翻訳領域をcbh1プロモータの下流に連結した。

まず、pUC-Eg3Xを鋳型にSCE3-StuとSCE3-XhoなるプライマーでPCRを行い、約1.5kbの増幅断片を回収し、pT7-blueにサブクローン化した。このプラスミドをStuIおよびXhoIで切断し、約1.5kbの断片を回収した。更に、実施例5aの様に構築したpCB1-MXをStuIおよびXhoIで切断し、約8.5kbの断片と、約1.5kbのStuI~XhoI断片とを連結し、これをpCB1-Eg3Xとした(図6)。

なお、上記操作によって得られたSCE3の翻訳領域の塩基配列は配列番号6に示される通りであった。

また、SCE3-StuとSCE3-Xhoの配列は以下に示される通りであった。

SCE3-Stu: 5'-GGG AGG CCT GCG CAT CAT GGC TCC ATT GCT GCT TGC-3' (配列番号 48)

SCE3-Xho: 5'-GGG CTC GAG TAC CTT ACT TCC TGG CGA GAC ACG AGC-3' (配列番号 49)

号49)

実施例12 : pCB1-Eg3X 形質転換体のSCE3生産性評価

実施例7と同様にしてプラスミドpCB1-Eg3X をTrichoderma viride MC300-1株に導入した。その結果、ハイグロマイシンB に耐性を示す株が1mg のDNA 当り約20株出現した。この20株をS 培地で前培養後、P 培地で本培養した。この培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、SCE3タンパク質と予想される分子量約50kDのバンドが観測された株が出現した。

このうち50kDのバンドがもっとも顕著に観察されるもの(EG3D2 株)のSCE3生産量をデニム染めセルロース含有繊維の脱色活性を指標に算出した。詳細には以下に示す条件で行った。

脱色処理は、糊抜きした12オンスのブルージーンズパンツ(木綿)を下記の条件で脱色処理した。

試験機械 ; 20kgワッシャー (SANYO 社製全自動洗濯機SCW5101)

浴比 ; 1 : 40

加熱 ; 60°C

時間 ; 30分

pH ; 4 (20mM酢酸緩衝液)

脱色度は色差計COLOR ANALYZER TOPSCAN MODEL TC-1800MK2 (東京電色株式会社製)を用い、Lab 表示計のL 値(明度)を測定した。コントロールに対するL 値の増加(白色度の増加) = ΔL 値より、脱色を評価した各試験区につき5 点の ΔL 値を測定し (n = 5)、最大値・最小値を棄却した3 点の平均値を採用した。そして、 ΔL 値=4 まで脱色するのに必要なタンパク質濃度を算出した。

タンパク質濃度はバイオラッド社製プロテインアッセイキットに従い γ グロブリンをスタンダードとして定量した。

親株であるTrichoderma viride MC300-1株の培養上澄は、ジーンズの脱色に必

要なタンパク質濃度は160mg/L であり、実施例9において単離精製されたSCE3は32mg/Lであった。EG3D2 株の培養上澄のジーンズの脱色に必要なタンパク質濃度は、精製SCE3を全タンパク質量の30%となるように加えたTrichoderma viride MC300-1株の培養上澄の脱色に必要なタンパク質濃度と一致し、その濃度は80mg/Lであった。このことから、EG3D2 株の培養上澄1L中に含まれる総タンパク質27g 中30% (9g) は(組み換え) SCE3が含まれていると考えられた。

実施例13 : SXY1の単離精製

Trichoderma viride MC300-1株をP 培地で培養し、その培養上澄をキシラン分解活性を指標に精製した。まず、Resource Q 6mL (ファルマシアバイオテク社製) に供し、50mM トリスー塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中0 -1M の塩化ナトリウム濃度勾配で溶出し、塩濃度0M の溶出画分を回収した。本画分をさらに、ファルマシアバイオテク社製Resource HIC PHE 1mL に供し、25mM トリスー塩酸 (pH 7.0) 緩衝液中1.5 -0M の硫酸アンモニウム濃度勾配で溶出し、硫酸アンモニウム濃度約0.3M で溶出される画分をSXY1画分として回収した。本画分はさらに、ファルマシアバイオテク社製Superdex 75 (10/30) ゲルろ過カラムに供し、0.1M 塩化ナトリウムを含む0.05M リン酸緩衝液で展開し、SXY1画分を回収した。このSXY1はSDS-PAGEにおいて約20kDの単一なバンドを示した。

実施例14 : SXY1遺伝子のクローニング

(14a) SXY1タンパク質のアミノ末端側アミノ酸配列解析

実施例13と同様にして得た精製SXY1をSDS-PAGEに供し、実施例10と同様の方法を用いてアミノ末端修飾残基を除去した。これをModel 492 アミノ酸シーケンサーに供し、アミノ末端側13残基のアミノ酸配列を解読した。その配列は以下に示される通りであった。

SXY1-N: Gln-Thr-Ile-Gly-Pro-Gly-Thr-Gly-Phe-Asn-Asn-Gly-Tyr-Phe (配列番号50)

このアミノ酸配列は、*Trichoderma reesei*株から得られたキシラナーゼI (XYLI) タンパク質のアミノ酸配列 (Anneli Torronen et. al., Bio/Technology (1992), 10, 1461) と相同性を示したことから、同タンパク質をコードする遺伝子のクローニングは*Trichoderma reesei*株由来のXYLI遺伝子の翻訳領域をPCRを用いて増幅し、用いた。

(14b) SXY1翻訳領域の増幅

SXY1翻訳領域を*Trichoderma viride* MC300-1株由来ゲノムDNAを鋳型にPCRにより増幅した。

増幅は、実施例1dの*Trichoderma viride* MC300-1株由来染色体DNAを鋳型にTakara Taqを用いて行った。プライマーとしてSXY1-NおよびSXY1-Cを用い、94℃1分間、50℃2分間、72℃3分間のサイクルを20回繰り返すことにより反応を行った。その結果、約0.7kbpのDNAが増幅された。

SXY1-NおよびSXY1-Cの配列は以下に示される通りであった。

SXY1-N: 5'-GGG AGG CCT GCG CAT CAT GGT CTC CTT CAC CTC CC-3' (配列番号51)

SXY1-C: 5'-GGG CTC GAG TAC CTT AGC TGA CGG TGA TGG AAG C-3' (配列番号52)

このPCR増幅断片をアガロースゲル電気泳動の後、ゲルから回収し以下に用いた。

実施例15 : SXY1発現ベクターpCB-XI'の構築

SXY1をcbh1プロモーターの制御下、大量に発現させるために、SXY1の翻訳領域をcbh1プロモータの下流に連結した。

まず、実施例14bと同様にPCRを行い、約0.7kbの増幅断片を回収し、pT7-blueにサブクローン化した。このプラスミドをStuI及びXhoIで切断し、約0.7kbの断片を回収した。更に、実施例5aの様に構築したpCB1-MXをStuI及びXhoIで切断

し、約8.5kbの断片と、約0.7kbのStuI~XhoI断片とを連結し、これをpCB-XI'とした(図7)。

実施例16 : pCB1-XI'形質転換体のSXY1生産性評価

実施例7と同様にしてプラスミドpCB-XI'をTrichoderma viride MC300-1株に導入した。その結果、ハイグロマイシンBに耐性を示す株が1mgのDNA当り約10株出現した。このうち46株をS培地で前培養後、P培地で本培養した。この培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、SXY1タンパク質と予想される分子量約20kDのバンドが観測された株が出現した。

このうち20kDのバンドがもっとも顕著に観察されるもの(S22株)のSXY1生産量をFPLCシステムを用いて定量した。カラムは前述Resource HIC PHE 1mLを用い、50mMトリス-塩酸(pH 7.5)緩衝液中1-0M硫酸アンモニウムの濃度勾配で溶出した。SXY1生産量は、対照として実施例13で得られた精製SXY1を用い、硫酸アンモニウム濃度約0.3Mで溶出されるピークの面積比で算出した。その結果、S22株のSXY1生産性は8.1g/Lであり、親株の13倍の生産性であった。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 4 1 7 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Trichoderma viride MC300-1

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 1 4 3 8 . . 1 4 8 8

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1 4 8 9 . . 3 1 0 8

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 1 8 9 9 . . 1 9 6 5

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 2 6 6 3 . . 2 7 2 4

特徴を決定した方法 : E

配列

AAGCTTCCAT TTGGCGGCTG AATACCCTGA GAATGAAAAC ACATCAGGCT GGGTGATATC 60
CATGAAGACA GGTGGTGAAT ATGTAATCAC GTCCGTTCTC CTGAAGGGAA ACCCCTTGTC 120

GTGGTCACAT GCGGCTCTTT CCATGTAAGT CGGATATTCC TAAGTAGCGA TGGAGCGGCA 180
GAATCAAATA GGCAATACAG CGAGTGGCTC GAACTTTTTA AATGTCGGGC GGGTTGCTGC 240
GCTTCGGCAC TAGTAGACAT TGTATTCCAT ACCCCGCCCC TGTTCGCG ACCTCTGGGA 300
TTCCCTTGAA TGATCAAATT CTCGCCTCTA CTACCTAACT CCCACTGAGC CTTTACGTCT 360
TTTGCCATTC ATCCTGGTGG AAGTTATCGC GGTGTGTAGG GCTACATGCT AGGTCAACTG 420
GACGTGTTGG GGCCCGGACC CGAACCTAAT TTTATACAAC GACTTTGATT CAGTCTACAG 480
TAATGGGACG TCCCCATATA CAGTTGCACG TAGGGCACAA CGGTAGAGTA CGTTGGGTGA 540
ATTCGATATG ATACGAGGAT AACCCCTGA ATGTAGAGTC TCACGGCAAA CTCTGACCGC 600
GCGGTGCGAE CTCACAAAAC AATACAAACG GATGGCTAAA AGTACATGAG TTAATGCCTA 660
AAGATGTCAT ATACCAGCGG CTAATAATTG TACAATTAAG TGGCTAAACG TACCGTAATT 720
TGCCAATGAC TTGTAGGGTT GCAGAAGCAA CAGTACAGCC CCACTTCCCC ACGTTTGCCC 780
TCTTACACGC AGGTCTAACC TCAACTGATG ATCTCCCATC TAAGTTCTCT TGTGTGTGTT 840
TAGTCTAAGA GGCAAGTGTT TACTTCAGGA TTTTGTAAGG CGTAGCATGT AAGAAATAAA 900
CAGAAAGCAG ACGCCAAGAA GCGAGTTTCT GGATGAAGGC GTTTGAGAGA ACCTGCAGG 960
GAGTTGTCTG ACAATAGAAA AACAATGGAT TGTCGCTTCT ACTCAGGTGT CTGTAATTAA 1020
ATGTTACTCC GTCCTGTACA GGCAAAAAAT ATAGTCGAAT CTGCCTAAGA TCTCGGGCCT 1080
TCGGGCCTTT AAGTCTACAG GTCAGTTTGG TTATATGGGC ATTTTGGGT GTGGTAGCAT 1140
TGAGGGAACC ACTGCTTTTG CCAAGGAGCT GAACGTATGC TGTAGGCAA GCTCTAGGTG 1200
CCACTGCATT TGTGTGAAC ATAATGTGAT GCTTGGGCAG GCATAATAGC CGCCAAAGAT 1260
AGCCTCATTG AGCGGAAGTC GGCGAACAGG TGAAGAGCAG AATATCACAT ATATATATGG 1320
CCCAAACGCC GTGTCCCCTT CTCCCTTTCC CCATCTACTC ATCAACTCAG ATCCTCCAGA 1380
AGACTTGAC ATCATCTTTT GGGGCATAGC ATTCTAGTCG ACTACGGACT GCGCATC 1437
ATG TAT CAA AAG TTG GCC CTC ATC TCG GCC TTC TTG GCT ACT GCT CGT 1485
Met Tyr Gln Lys Leu Ala Leu Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr Ala Arg

-17 -15

-10

-5

TCT TTC GAT GTT GAT GTT TCG CAG CTG CC GTAAGTGACC AACTACACCT 1918
 Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Pr
 130 135
 CTTGATGCCA TTCTCGTATT AGTTCTCAGC TGACTAGCTT ATTTAAG A TGT GGC TTG 1975
 o Cys Gly Leu
 140
 AAC GGA GCT CTT TAC TTC GTG TCC ATG GAC GCG GAT GGT GGC GTG AGC 2023
 Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val Ser
 145 150 155
 AAG TAT CCC ACC AAC ACT GCC GGT GCC AAG TAC GGC ACG GGC TAC TGT 2071
 Lys Tyr Pro Thr Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys
 160 165 170
 GAC AGC CAG TGC CCT CGT GAT CTC AAG TTC ATC AAC GGC CAG GCC AAT 2119
 Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn
 175 180 185
 GTT GAG GGC TGG GAG CCG TCC TCT AAC AAT GCC AAC ACG GGC ATT GGC 2167
 Val Glu Gly Trp Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly
 190 195 200
 GGA CAT GGA AGC TGC TGC TCT GAG ATG GAT ATC TGG GAG GCC AAT TCC 2215
 Gly His Gly Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser
 205 210 215 220
 ATC TCT GAG GCT CTT ACT CCT CAT CCT TGC ACG ACC GTC GGG CAG GAA 2263
 Ile Ser Glu Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu
 220 230 235

ATT TGC GAC GGT GAC TCC TGC GGT GGA ACC TAC TCG GGT GAC CGA TAT 2311
 Ile Cys Asp Gly Asp Ser Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Gly Asp Arg Tyr
 240 245 250
 GGC GGT ACT TGC GAC CCT GAT GGC TGC GAT TGG AAC CCA TAT CGC TTG 2359
 Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu
 255 260 265
 GGC AAC ACC AGC TTC TAT GGC CCC GGC TCC AGC TTC ACG CTT GAC ACC 2407
 Gly Asn Thr Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr
 270 275 280
 ACC AAG AAG TTG ACC GTC GTC ACT CAG TTC GAG ACT TCG GGT GCC ATC 2455
 Thr Lys Lys Leu Thr Val Val Thr Gln Phe Glu Thr Ser Gly Ala Ile
 285 290 295 300
 AAC CGA TAC TAT GTC CAG AAT GGC GTC ACT TTC CAG CAG CCC AAC GCC 2503
 Asn Arg Tyr Tyr Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala
 305 310 315
 GAG CTC GGT GAT TAC TCT GGC AAC TCG CTC GAC GAT GAC TAC TGC GCG 2551
 Glu Leu Gly Asp Tyr Ser Gly Asn Ser Leu Asp Asp Asp Tyr Cys Ala
 320 325 330
 GCT GAA GAG GCG GAG TTT GGC GGC TCC TCT TTC TCG GAC AAG GGC GGC 2599
 Ala Glu Glu Ala Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly
 335 340 345
 CTT ACT CAA TTC AAG AAG GCT ACT TCC GGT GGC ATG GTC CTG GTC ATG 2647
 Leu Thr Gln Phe Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met
 350 355 360

AGC CTG TGG GAT GAC GTGAGTTCAA GAATAACATT CACATTGTCA ACAGAATGAC 2702
 Ser Leu Trp Asp Asp
 365
 AGAACTGAC TGAGAGACGA TAG TAC TAC GCC AAC ATG CTG TGG CTG GAC TCT 2754
 Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser
 370 375
 ACC TAC CCG ACG AAC GAG ACC TCC TCC ACC CCC GGT GCC GTG CGT GGA 2802
 Thr Tyr Pro Thr Asn Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly
 380 385 390 395
 AGC TGC TCC ACC AGC TCC GGT GTT CCT GCT CAG CTC GAG TCC AAC TCT 2850
 Ser Cys Ser Thr Ser Ser Gly Val Pro Ala Gln Leu Glu Ser Asn Ser
 400 405 410
 CCC AAC GCC AAG GTC GTA TAC TCC AAC ATC AAG TTC GGC CCC ATC GGC 2898
 Pro Asn Ala Lys Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly
 415 420 425
 AGC ACC GGC AAC TCT AGC GGC GGA AAC CCT CCT GGC GGA AAC CCT CCC 2946
 Ser Thr Gly Asn Ser Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro
 430 435 440
 GGC ACC ACA ACC ACC CGC CGC CCG GCT ACC TCC ACT GGA AGC TCT CCC 2994
 Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Ser Thr Gly Ser Ser Pro
 445 450 455
 GGC CCT ACT CAG ACG CAC TAT GGC CAG TGC GGT GGA ATT GGA TAC TCG 3042
 Gly Pro Thr Gln Thr His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser
 460 465 470 475

GGC CCC ACC GTC TGC GCG AGT GGC AGC ACT TGC CAG GTC CTG AAC CCC 3090

Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Ser Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro

480

485

490

TAC TAC TCT CAG TGC TTG TAA GGTACTGTG GCAAAGCTT GAGGTACTGC 3140

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu ***

495

TGGCTTATGG ATGAGTTCAT CTCATTATGG ACTAGATGGA GGATTTACTT TGCTGTATCT 3200

ACTTCTGAGG CTTCCAATAT ATACGGTTAT TTCACCTTTG CTGGAATGCT CGCTAGCTTG 3260

GCAAGCACGG CTTTCGAGAG ACGGACTGAT TCTCTGCTAA CTATGCATTA TATAAGACTG 3320

AAATAGACAA AAAAGGAAAA AAGTTGCCAC TCGAATTATC TTGACGGTGT TGATTATATG 3380

TATGGCATTG TAAGGGTTTT TCATTGATAT TTCTCCCGCC AATATGGTTC TACTCCCATC 3440

TCCGCGAATC TCCTTTTCTC GAAGGCCGTA GTGGCAGGCC AATTGGCAAC AACCCACAGG 3500

GAGACGAAAA ACATGATGGC GGCAGCCGAA ATCAGTGGCG CAATGATTGA AAACACGGTG 3560

AGACCGTAGC TTGCAGCCTG GAAAGCACTG TTGGAGACCA GCTTGTCCGT TCGGAGGCCG 3620

ACTTGCATTG CTGTCAAGAC GATGGCAATG TAGCCGAGCA CTGTCACCAG GGACGCAAAG 3680

TTGTGCGGGA TAAGGTCTCC GTAGATGGCG TAGCCAGAGA TTCGAGAATA GCCTCTCAA 3740

AGGTGGCCCT TTCGAAACCG GTAAATCTTG TTCAAGCGTC CTAGGCGCAG CTCGCCGTAC 3800

CAGTAGCGGG GATTGACAGC AGAATAGCAG TGATTCTCCA GGAATTGACT GGACAATATC 3860

TTCCAGTACT CCCAAGATAC AATATCCGGC AAGAGTCCCT TCTCACGTGC GAGGCGAAAG 3920

TCGCTGTAGT GCGCAATGAG AGCGCAGTAG GAGAATAGAA ACCCCCTGGC ACATTGTTCT 3980

ACCTCGGCGT GTAGTGGATG ACTGTCGGGC AGAATGTGCT GTCTCCAGAA TCCGATGTCT 4040

AGTAGATACT CTGGCAGAGG CTTCAGGTGA ATGCCCTTGG GACCCAGAT GAGATGCAGC 4100

TCCGGATTCT CAGTAACGAC GATCTCGCGG GAGAGCACGA GTTGGTGATG AAGAGGGCGA 4160

GGAGGCATGG GTCGAC 4176

配列番号 : 2

配列の長さ : 5 1 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

```

Met Tyr Gln Lys Leu Ala Leu Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr Ala Arg
-17      -15                      -10                      -5
Ala Gln Ser Ala Cys Thr Leu Gln Ala Glu Thr His Pro Pro Leu Thr
      +1              5              10              15
Trp Gln Lys Cys Ser Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly Ser
              20              25              30
Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Ala Thr Asn Ser Ser
              35              40              45
Thr Asn Cys Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Ser Ser Thr Leu Cys Pro Asp
              50              55              60
Asn Glu Thr Cys Ala Lys Asn Cys Cys Leu Asp Gly Ala Ala Tyr Ala
              65              70              75
Ser Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Ala Asp Ser Leu Ser Ile Gly Phe
              80              85              90              95
Val Thr Gln Ser Ala Gln Lys Asn Val Gly Ala Arg Leu Tyr Leu Met
              100             105             110
Ala Ser Asp Thr Thr Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Leu Gly Asn Glu Phe
              115             120             125

```

Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala
130 135 140
Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr Pro
145 150 155
Thr Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln
160 165 170 175
Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly
180 185 190
Trp Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly Gly His Gly
195 200 205
Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu
210 215 220
Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Asp
225 230 235
Gly Asp Ser Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Thr
240 245 250 255
Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr
260 265 270
Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys
275 280 285
Leu Thr Val Val Thr Gln Phe Glu Thr Ser Gly Ala Ile Asn Arg Tyr
290 295 300
Tyr Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly
305 310 315

4 3

Asp Tyr Ser Gly Asn Ser Leu Asp Asp Asp Tyr Cys Ala Ala Glu Glu
320 325 330 335
Ala Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln
340 345 350
Phe Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
355 360 365
Asp Asp Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr
370 375 380
Asn Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr
385 390 395
Ser Ser Gly Val Pro Ala Gln Leu Glu Ser Asn Ser Pro Asn Ala Lys
400 405 410 415
Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn
420 425 430
Ser Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr
435 440 445
Thr Arg Arg Pro Ala Thr Ser Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln
450 455 460
Thr His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val
465 470 475
Cys Ala Ser Gly Ser Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln
480 485 490 495
Cys Leu

配列番号 : 3

配列の長さ 2 8 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Ala Cys Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro
-2 1 5 10
Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro Val Phe Ser
15 20 25 30
Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala Lys Ser Gly
35 40 45
Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp
50 55 60
Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ala
65 70 75
Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe
80 85 90
Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Ser Thr Ser
95 100 105 110
Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly
115 120 125
Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu
130 135 140

Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu Cys Asp Arg
145 150 155
Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe
160 165 170
Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val Gln Cys Pro
175 180 185 190
Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly Asn
195 200 205
Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Gly
210 215 220
Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro
225 230 235
Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp Ala
240 245 250
Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala Gly
255 260 265 270
Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu
275 280

配列番号 : 4

配列の長さ : 9 2 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c D N A

起源

生物名 : *Humicola insolens*

配列の特徴

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 2 9 7 . . 3 3 4

特徴を決定した方法 : E

配列

```

GCA TGC GCT GAT GGC AAG TCC ACC CGC TAC TGG GAC TGC TGC AAG CCT   48
Ala Cys Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro
-2      1              5              10
TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG AAC CAG CCT GTC TTC TCC   96
Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro Val Phe Ser
15              20              25              30
TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT CTC ACT GAC TTC GAC GCC AAG TCC GGC  144
Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala Lys Ser Gly
35              40              45
TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC GCC GAC CAG ACC CCA TGG  192
Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp
50              55              60
GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG TTC GGT TTT GCT GCC ACC TCT ATT GCC  240
Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ala
65              70              75
GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC TGC TAC GA GTAAGCTTTG   288
Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Gl
80              85              90

```


GTCGCGTGTG TAACACTGTG CAGGCATAGC ACTAACCACC TCCCAG G CTC ACC 341
 u Leu Thr
 TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG GTC GTC CAG TCC ACC 389
 Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Ser Thr
 95 100 105
 AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC GAT CTC AAC ATC CCC 437
 Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro
 110 115 120 125
 GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT CCC CAG TTC GGC GGT 485
 Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly
 130 135 140
 CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC CGC AAC GAG TGC GAT 533
 Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu Cys Asp
 145 150 155
 CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC TGG CGC TTC GAC TGG 581
 Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp
 160 165 170
 TTC AAG AAC GCC GAC AAC CCG AGC TTC AGC TTC CGT CAG GTC CAA TGC 629
 Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val Gln Cys
 175 180 185
 CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC CGC AAC GAC GAC GGC 677
 Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp Asp Gly
 190 195 200 205

AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC ACC AGC TCT CCG GTC 725
Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val
210 215 220
GGC CAG CCT ACC AGT ACC AGC ACC ACC TCC ACC TCC ACC ACC TCG AGC 773
Gly Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser
225 230 235
CCG CCC GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC ACT GCT GAG AGG TGG 821
Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu Arg Trp
240 245 250
GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC ACC ACC TGC GTC GCT 869
Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys Val Ala
255 260 265
GGC AGC ACC TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC CAT CAG TGC CTG TAA 917
Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys Leu ***
270 275 280
GGTAGTCGAC 927

配列番号 : 5

配列の長さ : 418

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Asn Arg Thr Met Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Phe

-20

-15

-10

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 -5 1 5 10
 Gly Trp Ser Gly Pro Thr Ser Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
 15 20 25
 Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Ser Ile Thr
 30 35 40
 Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Arg Ala Thr
 45 50 55
 Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
 60 65 70 75
 Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
 80 85 90
 Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ala
 95 100 105
 Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp
 110 115 120
 Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
 125 130 135
 Asn Asn Asn Leu Gly Gly Thr Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
 140 145 150 155
 Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Val Tyr Cys Ile Ile
 160 165 170
 Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
 175 180 185

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
190 195 200
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro
205 210 215
His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
220 225 230 235
Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Pro
240 245 250
Gly Asn Asp Tyr Gln Ser Ala Ala Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
255 260 265
Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
270 275 280
Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
285 290 295
Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ala Pro Leu Ala
300 305 310 315
Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
320 325 330
Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Leu Cys Gln Gln Ile Gln
335 340 345
Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ala Gly Trp Gly
350 355 360
Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
365 370 375

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala

380

385

390

395

Arg Lys

配列番号 : 6

配列の長さ : 1 4 6 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Trichoderma viride* MC300-1

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 14 . . 76

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 77 . . 1450

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 343 . . 525

特徴を決定した方法 : E

配列

AGGCCTGCGC ATC ATG AAC AGG ACC ATG GCT CCA TTG CTG CTT GCA GCG 49
 Met Asn Arg Thr Met Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala
 -20 -15 -10
 TCG ATA CTC TTC GGG GGC GCT GCT GCA CAA CAG ACT GTC TGG GGA CAG 97
 Ser Ile Leu Phe Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln
 -5 -1 1 5
 TGT GGA GGT ATT GGT TGG AGC GGA CCT ACG AGT TGT GCT CCT GGA TCA 145
 Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Ser Cys Ala Pro Gly Ser
 10 15 20
 GCT TGT TCT ACT CTC AAT CCT TAT TAT GCG CAA TGC ATT CCG GGG GCC 193
 Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala
 25 30 35
 ACT AGT ATC ACC ACC TCG ACC CGA CCC CCC TCG GGT CCA ACC ACC ACC 241
 Thr Ser Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr
 40 45 50 55
 ACC AGA GCC ACC TCA ACG ACC TCA TCT CCG CCA CCG ACC AGC TCT GGA 289
 Thr Arg Ala Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Pro Thr Ser Ser Gly
 60 65 70
 GTT CGA TTT GCT GGC GTT AAC ATC GCG GGC TTT GAC TTC GGA TGT ACC 337
 Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr
 75 80 85
 ACA GA GTATGTCTTC ATGTTGCATA GTGTTGCTGG CTGAGTATTC TGGGCGGATG 392
 Thr As
 ATTTATAGCT GTGCGGGCTG CAAAACACCG CCGGTCTGCC ACTATCAAGG CATAGTTGAT 452

AGGCGGCGGT GTTTTCTTCA ATCCCCTGAT TACACTCTCA AGAATCTAGT GGCTGATGGA 512
 TGTATGATTA CAG T GGC ACT TGC GTT ACA TCG AAG GTT TAT CCT CCG TTG 562
 P Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu
 90 95 100
 AAG AAC TTC ACT GGG GCA AAC AAC TAC CCG GAC GGT ATC GGC CAG ATG 610
 Lys Asn Phe Thr Gly Ala Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met
 105 110 115
 CAG CAC TTC GTC AAC GAT GAT GGG ATG ACT ATT TTC CGC CTA CCC GTC 658
 Gln His Phe Val Asn Asp Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val
 120 125 130
 GGA TGG CAG TAC CTC GTA AAC AAC AAT CTG GGT GGA ACT CTC GAT TCC 706
 Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly Gly Thr Leu Asp Ser
 135 140 145
 ACC AGT ATC TCG AAG TAT GAT CAG CTC GTT CAG GGG TGC CTG TCT CTC 754
 Thr Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu
 150 155 160 165
 GGT GTA TAC TGC ATC ATC GAC ATC CAC AAT TAT GCT CGA TGG AAC GGT 802
 Gly Val Tyr Cys Ile Ile Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly
 170 175 180
 GGA ATC ATT GGC CAG GGA GGC CCT ACA AAT GCC CAG TTT ACC AGT CTT 850
 Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu
 185 190 195
 TGG TCG CAG TTG GCA TCG AAG TAC GCG TCT CAG TCG AGG GTG TGG TTC 898
 Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe
 200 205 210

GGA ATA ATG AAT GAG CCC CAC GAC GTG AAC ATC AAC ACT TGG GCT GCC 946
 Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala
 215 220 225
 ACG GTT CAA GAG GTC GTC ACT GCA ATC CGC AAC GCC GGT GCT ACG TCG 994
 Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser
 230 235 240 245
 CAA TAC ATT TCT CTG CCT GGA AAT GAT TAT CAA TCT GCG GCA GCT TTT 1042
 Gln Tyr Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Tyr Gln Ser Ala Ala Ala Phe
 250 255 260
 ATT TCC GAT GGC AGT GCA GCC GCC CTG TCT CAG GTA ACG AAC CCT GAT 1090
 Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp
 265 270 275
 GGA TCA ACA ACG AAT CTA ATC TTC GAT GTC CAC AAG TAC TTA GAC TCG 1138
 Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser
 280 285 290
 GAC AAC TCC GGT ACT CAC GCC GAA TGC ACT ACA AAC AAC ATC GAC GGC 1186
 Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly
 295 300 305
 GCC TTT GCT CCT CTC GCC ACT TGG CTT CGA CAG AAC AAC CGC CAG GCT 1234
 Ala Phe Ala Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala
 310 315 320 325
 ATT CTG ACG GAA ACC GGC GGT GGC AAT GTT CAG TCC TGC ATC CAA GAT 1282
 Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp
 330 335 340

TTG TGC CAA CAG ATC CAG TAC CTC AAC CAG AAC TCA GAT GTC TAT CTT 1330
 Leu Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu
 345 350 355
 GGC TAT GCT GGC TGG GGT GCC GGT TCA TTT GAT AGC ACT TAT ATT CTG 1378
 Gly Tyr Ala Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Ile Leu
 360 365 370
 ACG GAA ACG CCT ACT GGA AGC GGT AAC TCG TGG ACG GAC ACA TCC CTA 1426
 Thr Glu Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu
 375 380 385
 GTT AGC TCG TGT CTC GCC AGG AAG TAAGGTACTC GAG 1463
 Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys
 390 395

配列番号：7

配列の長さ：2 2 3

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Val Ser Phe Thr Ser Leu Leu Ala Gly Val Ala Pro Ile Ser Gly
 -33 -30 -25 -20
 Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Val Glu Ser Val Asp Val Glu Lys
 -15 -10 -5
 Arg Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr
 -1 1 5 10 15

Ser Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro
 20 25 30
 Gly Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp
 65 70 75
 Ser Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr
 80 85 90 95
 Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp
 100 105 110
 Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser
 115 120 125
 Ile Glu Gly Thr Ser Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr
 130 135 140
 His Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp
 145 150 155
 Ala Ser His Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala
 160 165 170 175
 Val Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

配列番号 : 8

配列の長さ : 822

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Trichoderma viride* MC300-1

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : s i g p e p t i d e

存在位置 : 14 . . 112

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : m a t p e p t i d e

存在位置 : 113 . . 809

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : i n t r o n

存在位置 : 286 . . 412

特徴を決定した方法 : E

配列

AGGCCTGCGC ATC ATG GTC TCC TTC ACC TCC CTC CTC GCC GGC GTC GCG CCC 52

Met Val Ser Phe Thr Ser Leu Leu Ala Gly Val Ala Pro

-33 -30 -25

ATC TCC GGA GTC TTG GCC GCT CCC GCT GCT GAG GTC GAG TCC GTG GAC 100

Ile Ser Gly Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Val Glu Ser Val Asp

-20 -15 -10 -5

GTT GAA AAG CGC CAG ACG ATT CAG CCC GGC ACG GGC TAC AAC AAC GGC 148
 Val Glu Lys Arg Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly
 -1 1 5 10
 TAC TTC TAC TCG TAC TGG AAC GAC GGC CAC GGC GGC GTG ACG TAC ACC 196
 Tyr Phe Tyr Ser Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr
 15 20 25
 AAT GGC CCC GGC GGC CAG TTC TCC GTC AAC TGG TCC AAC TCG GGC AAC 244
 Asn Gly Pro Gly Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn
 30 35 40
 TTT GTC GGC GGC AAG GGA TGG CAG CCC GGC ACC AAG AAC AA 285
 Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Ly
 45 50 55
 GTAAGACTAT ATACAACCCC ACCTTCTGAC CAAACCCCT ATCCAACGAC AGAATATAAA 345
 ACCAAGGGCG TGATTATCAT GGAGAGAGAG AGTGTGTGTG ATCTAACGGT TTTGTTCTGA 405
 AAACAAG G GTC ATC AAC TTC TCG GGC ACC TAC AAC CCC AAC GGC AAC 452
 s Val Ile Asn Phe Ser Gly Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn
 60 65 70
 AGC TAC CTC TCC GTG TAC GGC TGG TCG CGC AAC CCC CTG ATC GAG TAC 500
 Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr
 75 80 85
 TAC ATC GTC GAG AAC TTT GGC ACC TAC AAC CCG TCC ACC GGC GCC ACC 548
 Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr
 90 95 100

AAG CTG GGC GAG GTG ACG TCG GAC GGC AGC GTC TAC GAC ATC TAC CGC 596
Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg
105 110 115

ACG CAG CGC GTC AAC CAG CCG TCC ATC GAG GGC ACC TCC ACC TTT TAC 644
Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Glu Gly Thr Ser Thr Phe Tyr
120 125 130 135

CAG TAC TGG TCC GTC CGC CGC ACC CAC CGC TCC AGC GGC TCC GTC AAC 692
Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr His Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn
140 145 150

ACG GCG AAC CAC TTC AAC GCG TGG GCC TCG CAC GGC CTG ACG CTG GGC 740
Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Ser His Gly Leu Thr Leu Gly
155 160 165

ACC ATG GAT TAC CAG ATT GTT GCC GTG GAG GGC TAC TTT AGC TCT GGC 788
Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly
170 175 180

TCT GCT TCC ATC ACC GTC AGC TAAGGTACTC GAG 822
Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
185 190

配列番号 : 9

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : N末端フラグメント

起源

生物名 : *Trichoderma viride* MC300-1

配列

Ser Ala Xaa Thr Leu Gln Ala Glu Thr His

1

5

10

配列番号 : 10

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間フラグメント

起源

生物名 : *Trichoderma viride* MC300-1

配列

Glu Phe Ser Phe Asp Val

1

5

配列番号 : 11

配列の長さ : 18

配列の型 : アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間フラグメント

起源

生物名：Trichoderma viride MC300-1

配列

Glu Thr His Pro Pro Leu Thr Trp Gln Lys Xaa Ser Ser Gly Gly Thr

1 5 10 15

Xaa Thr

配列番号：12

配列の長さ：18

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

ATGTATCAAA AGTTGGCC 18

配列番号：13

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

TTACAAGCAC TGAGAGTAG 19

配列番号：14

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

TCACCTTCCA GCAGCCCAAC GCC

配列番号：15

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CAACTCTCCC AACGCCAAGG TCG

配列番号：16

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CGTCGGGTAG GTAGAGTCCA GCC

配列番号：17

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

TCTCGAACTG AGTGACGACG GTC

配列番号：18

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CTGCCATGTC AGAGGCGGGT GAG

配列番号：19

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

ACTCCAACAT CAAGTTCGGC CCC

配列番号：2 0

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

AACTCCCACT GAGCCTTTAC GTC

配列番号：2 1

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CAATTAAGTG GCTAAACGTA CCG

配列番号：2 2

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GCAAAAATAT AGTCGAATCT GCC

配列番号：23

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GCTGGAATGC TCGCTAGCTT GGC

配列番号：24

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

ACTGTTGGAG ACCAGCTTGT CCG

配列番号：25

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CGCAGTAGGA GAATAGAAAC CCC

配列番号：2 6

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CTGCTGTCAA TCCCCGCTAC TGG

配列番号：2 7

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CCTTCGAGAA AAGGAGATTC GCG

配列番号：2 8

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CAGCTCCTTG GCAAAAGCAG TGG

配列番号：29

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

AGATCATCAG TTGAGGTTAG ACC

配列番号：30

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

TGTATAAAAT TAGGTTCGGG TCC

配列番号：31

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CTACTCATCA ACTCAGATCC TCC

配列番号：32

配列の長さ：24

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGAAGCCTCA GAAGTAGATA CAGC

配列番号：33

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

TCGACTACGG ACTGCGCATC

配列番号：34

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

CAAGCTTTTG CCACAGTACC

配列番号：35

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GATACATGAT GCGCAGGCCT TAGTCGACTA GAATGC

配列番号：36

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GATCCTCAAG CTTTGTCTCG AGTACCTTAC AAGCAC

配列番号：37

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGAGGGTGCA TGCCGACTGA GCCCGGGCAG TAGCC

配列番号：38

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GCCGGGAGAG GATCCAGTGG AGG

配列番号：39

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GCTCGAGTAC CTTACTGCAG GCACTGAGAG

配列番号：40

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGGGCATGCG CTGATGGCAA GTCCACCCG

配列番号：41

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGGGTCGACT ACCTTACAGG CACTGATGGT ACC

配列番号：42

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

生物名：Trichoderma viride MC300-1

配列

Gln Asp Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile

1

5

10

配列番号：43

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：中間フラグメント

起源

生物名 : Trichoderma viride MC300-1

配列

Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp

1 5 10

配列番号 : 44

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間フラグメント

起源

生物名 : Trichoderma viride MC300-1

配列

Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu

1 5

配列番号 : 45

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

フラグメント型 : 中間フラグメント

起源

生物名 : Trichoderma viride MC300-1

配列

Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Xaa Thr Thr

1

5

10

15

配列番号：46

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

ATGAACAAGT CCGTGGCTC

配列番号：47

配列の長さ：23

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

TTACTTTCTT GCGAGACACG AGC

配列番号：48

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGGAGGCCTG CGCATCATGG CTCCATTGCT GCTTGC

配列番号：49

配列の長さ：36

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGGCTCGAGT ACCTTACTTC CTGGCGAGAC ACGAGC

配列番号：50

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

生物名：Trichoderma viride MC300-1

配列

Gln Thr Ile Gly Pro Gly Thr Gly Phe Asn Asn Gly Tyr Phe

1

5

10

配列番号：51

配列の長さ：35

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGGAGGCCTG CGCATCATGG TCTCCTTCAC CTCCC

配列番号：52

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成核酸

配列

GGGCTCGAGT ACCTTAGCTG ACGGTGATGG AAGC

請 求 の 範 囲

1. *Trichoderma viride*由来のセルラーゼcbhl遺伝子の制御配列。
2. プラスミドpA01中のcbhl遺伝子のプロモーター配列。
3. cbhl遺伝子のアミノ末端から上流の1.5kb までの領域中に存在する配列または高プロモーター活性を保持するその改変配列を含んでなる、請求項2記載のプロモーター配列。
4. cbhl遺伝子のアミノ末端から上流の1.5kb 中に存在する配列が、プラスミドpA01中のcbhl遺伝子のアミノ末端から上流のHindIII サイトまでの配列である、請求項3に記載のプロモーター配列。
5. プラスミドpA01中のcbhl遺伝子のシグナル配列。
6. 配列番号1に記載のアミノ酸配列の-17から-1までの配列をコードする塩基配列、またはこれら塩基配列の改変配列であって、シグナル配列活性を保持するアミノ酸配列をコードする塩基配列である、請求項に5記載のシグナル配列。
7. プラスミドpA01中のcbhl遺伝子のターミネーター配列。
8. cbhl遺伝子のカルボキシル末端から下流の1kb までの領域中に存在する配列またはターミネーター活性を保持するその改変配列を含んでなる、請求項7記載のターミネーター配列。
9. cbhl遺伝子のカルボキシル末端から下流の1kb 中に存在する配列が、プラスミドpA01中のcbhl遺伝子のカルボキシル末端から下流のSalIサイトまでの配列である、請求項8に記載のターミネーター配列。
10. 請求項1に記載の*Trichoderma viride*由来のセルラーゼcbhl遺伝子の制御配列を含んでなる、発現ベクター。
11. 前記制御配列に作動可能に連結された目的タンパク質またはペプチド

をコードする塩基配列を含んでなる、請求項10に記載の発現ベクター。

12. 請求項2～9のいずれか一項に記載のプロモーター配列、シグナル配列、およびターミネータ配列からなる群から選ばれる少なくとも一つの配列を含んでなる発現ベクター。

13. 請求項2～4のいずれか一項に記載のプロモータ配列を含んでなる、請求項12記載の発現ベクター。

14. 前記配列に作動可能に連結された目的タンパク質またはペプチドをコードする塩基配列を含んでなる、請求項12または13のいずれか一項に記載の発現ベクター。

15. 前記目的タンパク質が、*Humicola insolens* 由来のエンドグルカナーゼまたはその改変タンパク質である、請求項11～14のいずれか一項に記載の発現ベクター。

16. *Humicola insolens* 由来のエンドグルカナーゼがエンドグルカナーゼNCE4である、請求項15に記載の発現ベクター。

17. 前記目的タンパク質が、*Trichoderma viride* 由来のエンドグルカナーゼまたはその改変タンパク質である、請求項11～14のいずれか一項に記載の発現ベクター。

18. 前記*Trichoderma viride* 由来のエンドグルカナーゼがエンドグルカナーゼSCE3である、請求項17に記載の発現ベクター。

19. 前記目的タンパク質が、*Trichoderma viride* 由来のキシラナーゼまたはその改変タンパク質である、請求項11～14のいずれか一項に記載の発現ベクター。

20. 前記*Trichoderma viride* 由来のキシラナーゼがキシラナーゼSXY1である、請求項19に記載の発現ベクター。

21. 選択マーカーを更に含んでなる、請求項10～20のいずれか一項に

記載の発現ベクター。

22. 選択マーカーがハイグロマイシンB 耐性遺伝子である、請求項21に記載の発現ベクター。

23. 発現ベクターpCB1-MX、pCB1-M2XR、pCB1-HEgX。pCB1-Eg3X、またはpCB1-XI'。

24. 請求項10～23のいずれか一項に記載の発現ベクターによって形質転換された、宿主細胞。

25. 宿主細胞が、Trichoderma 属に属する微生物である、請求項24に記載の宿主細胞。

26. Trichoderma 属に属する微生物がTrichoderma virideである、請求項25に記載の宿主細胞。

27. Trichoderma 属に属する微生物がTrichoderma virideのセルラーゼ高生産株であるTrichoderma viride MC300-1株またはその系統である、請求項26に記載の宿主細胞。

28. 請求項24～27のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し、培養物から前記目的タンパク質を採取する工程を含んでなる、目的タンパク質の生産方法。

29. その培養液1Lあたり7g以上の目的タンパク質を生産する、請求項28に記載の方法。

30. その培養液1Lあたり15g 以上の目的タンパク質を生産する、請求項28に記載の方法。

31. 請求項28～30のいずれか一項に記載の方法によって生産されたタンパク質またはそれを含んでなる組成物。

32. 配列番号2に示される配列またはセルラーゼ活性を保持するその改変配列。

- 33. 請求項32に記載の配列をコードする、塩基配列。
- 34. 配列番号1に示される配列を有する、請求項33に記載の塩基配列。

1 / 7

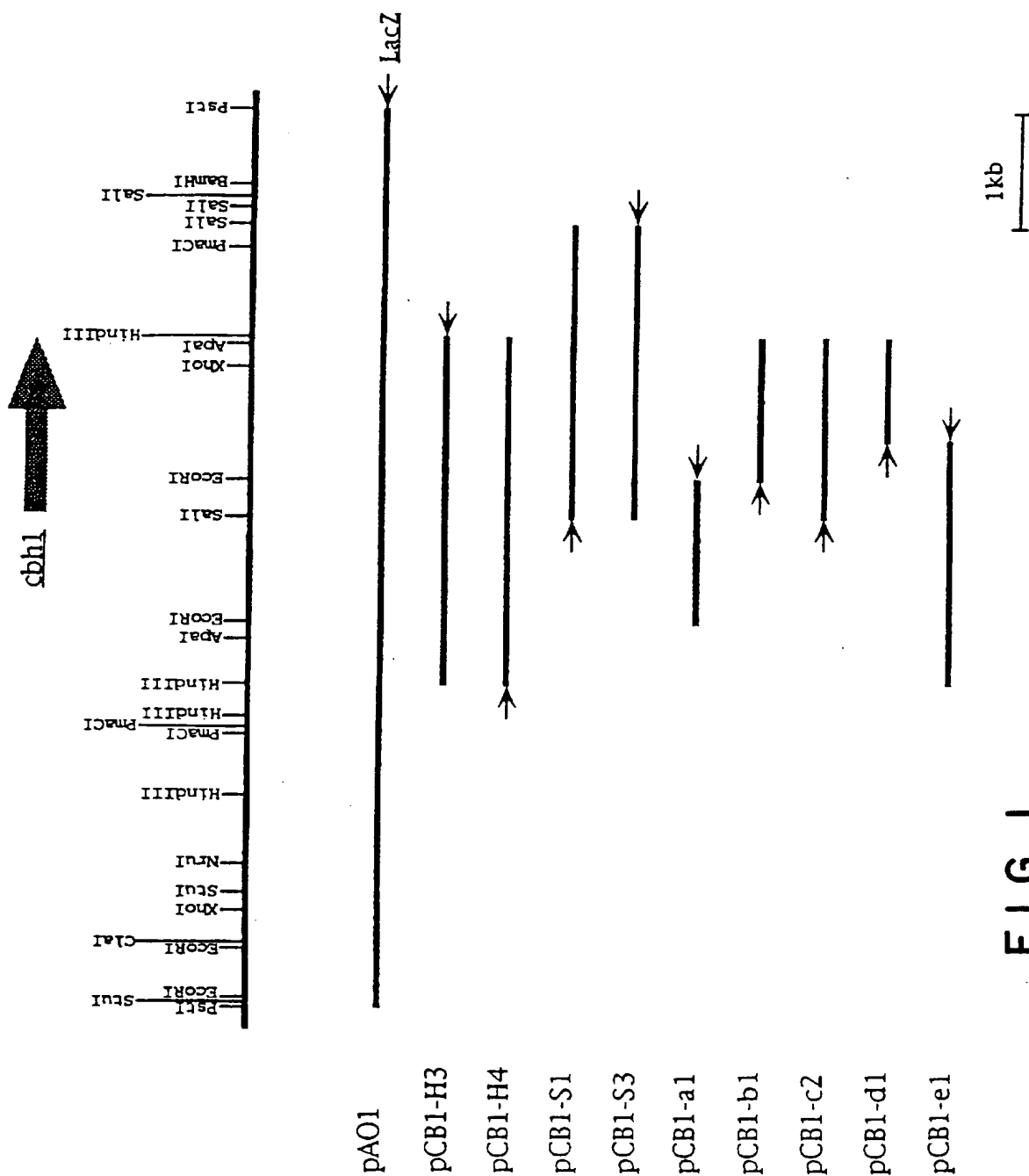


FIG. 1

2 / 7

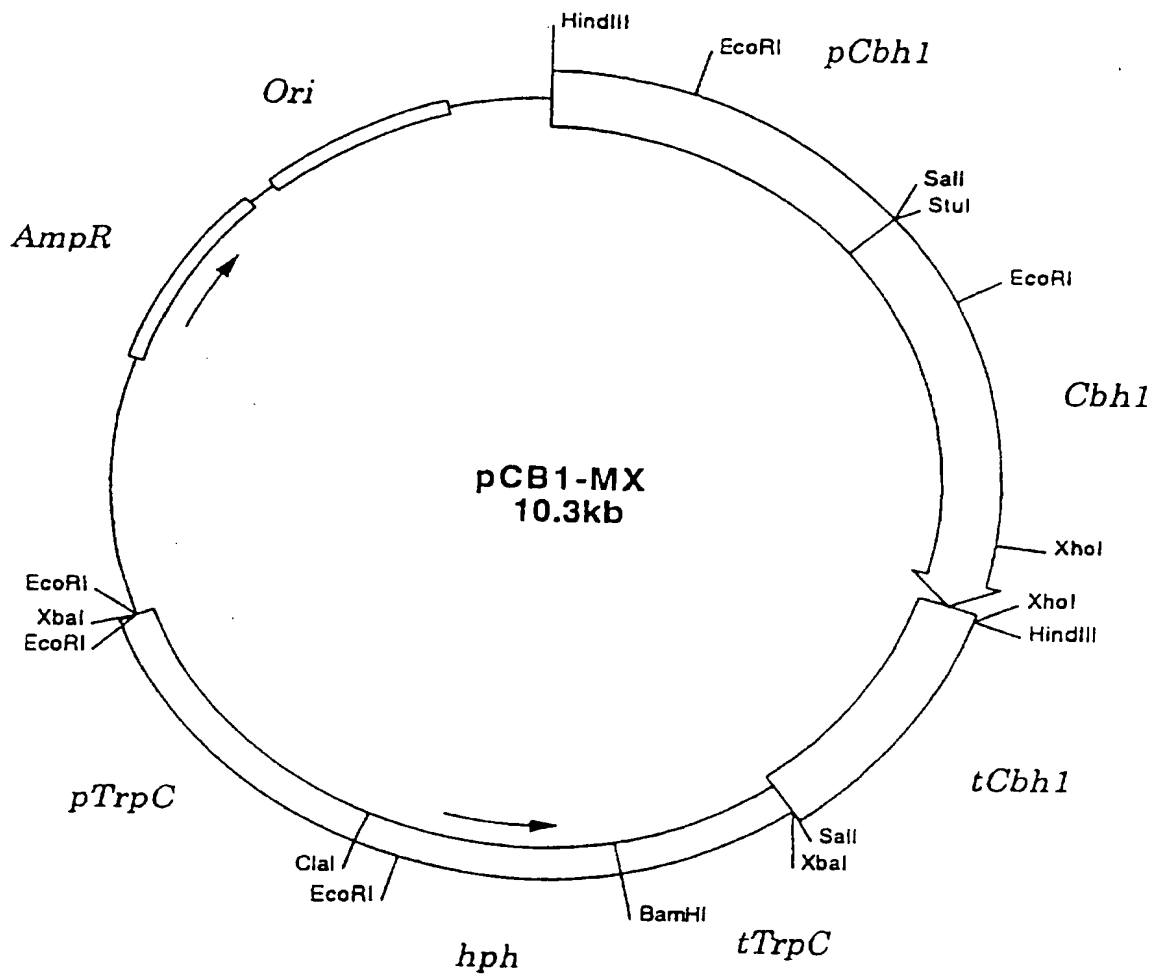
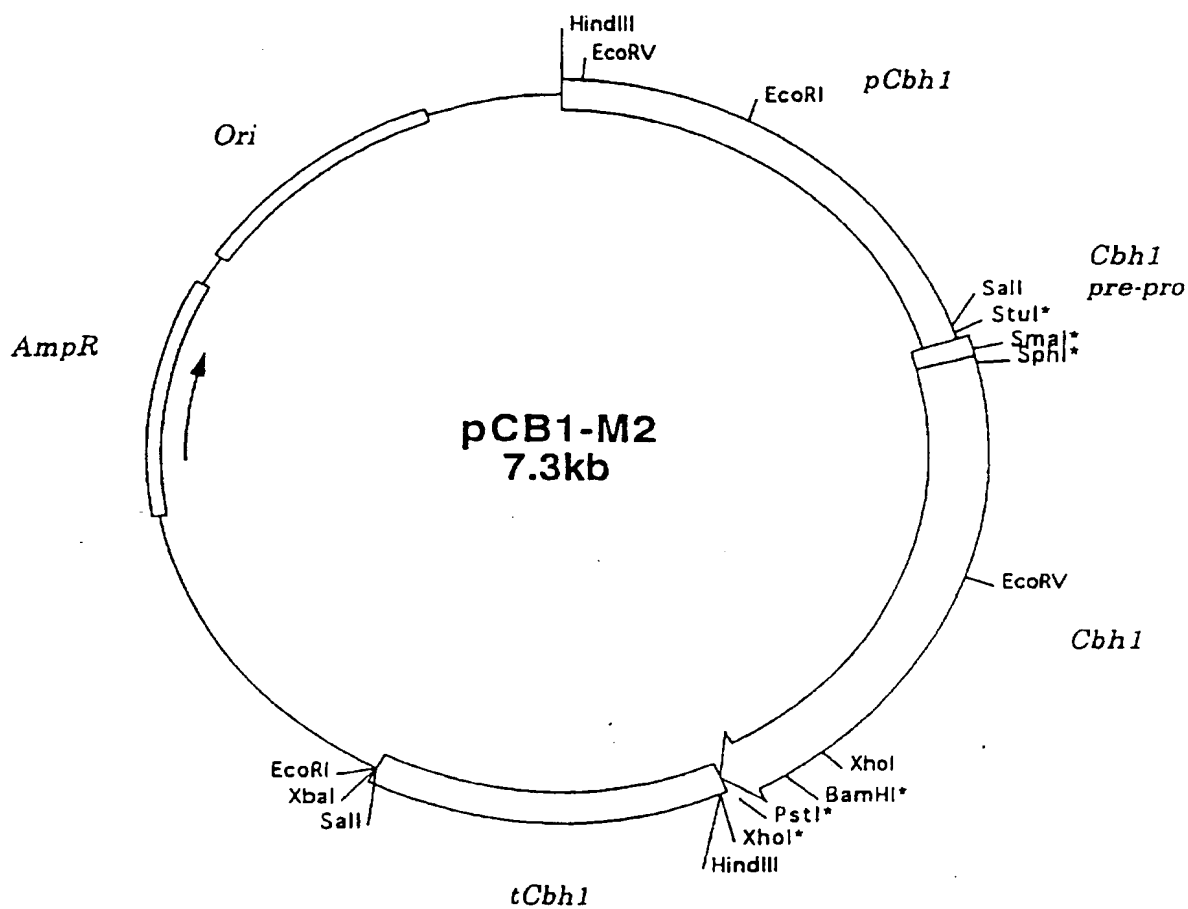


FIG. 2

3 / 7



*: mutagenesis introduced.

FIG. 3

4 / 7

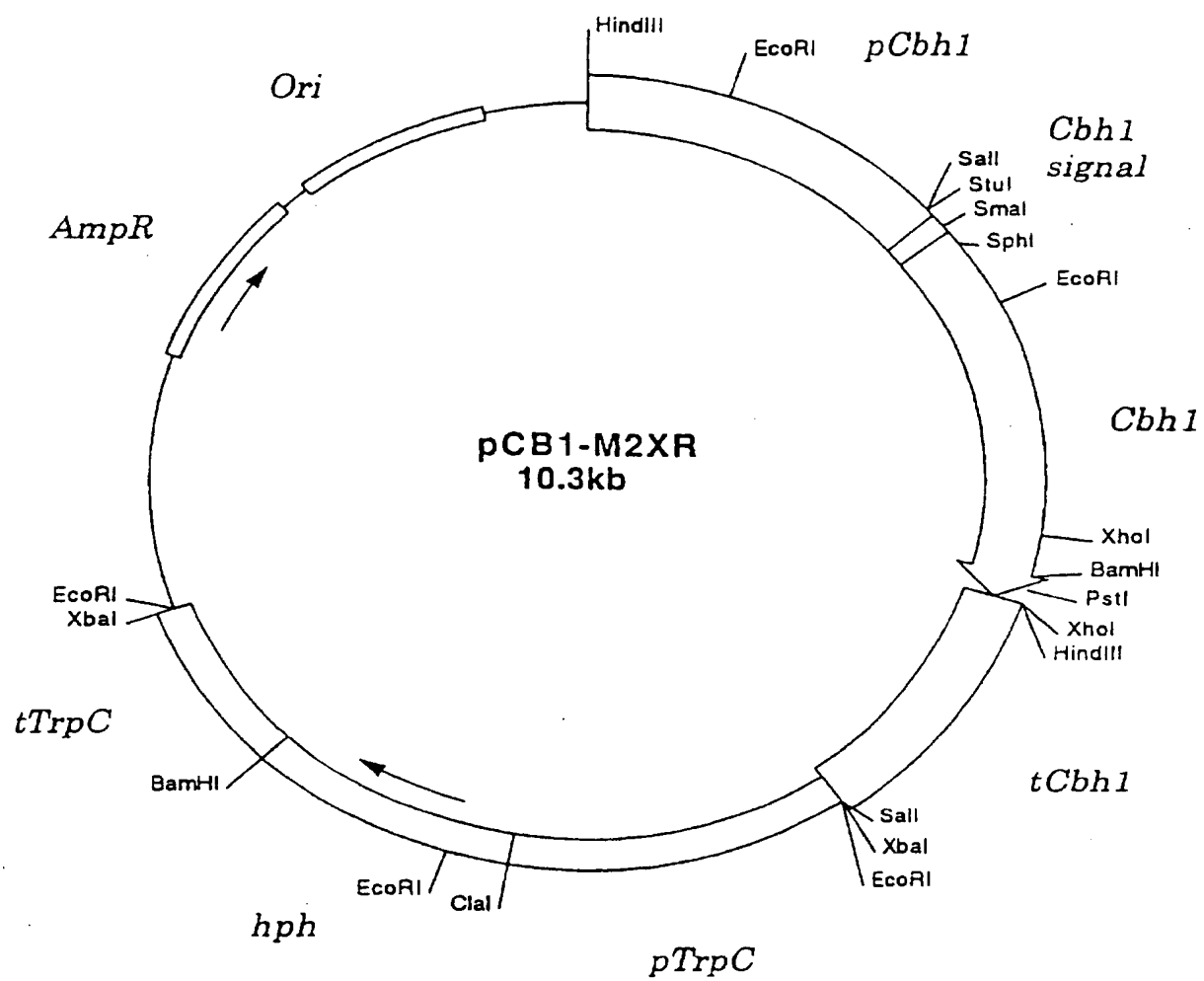


FIG. 4

5 / 7

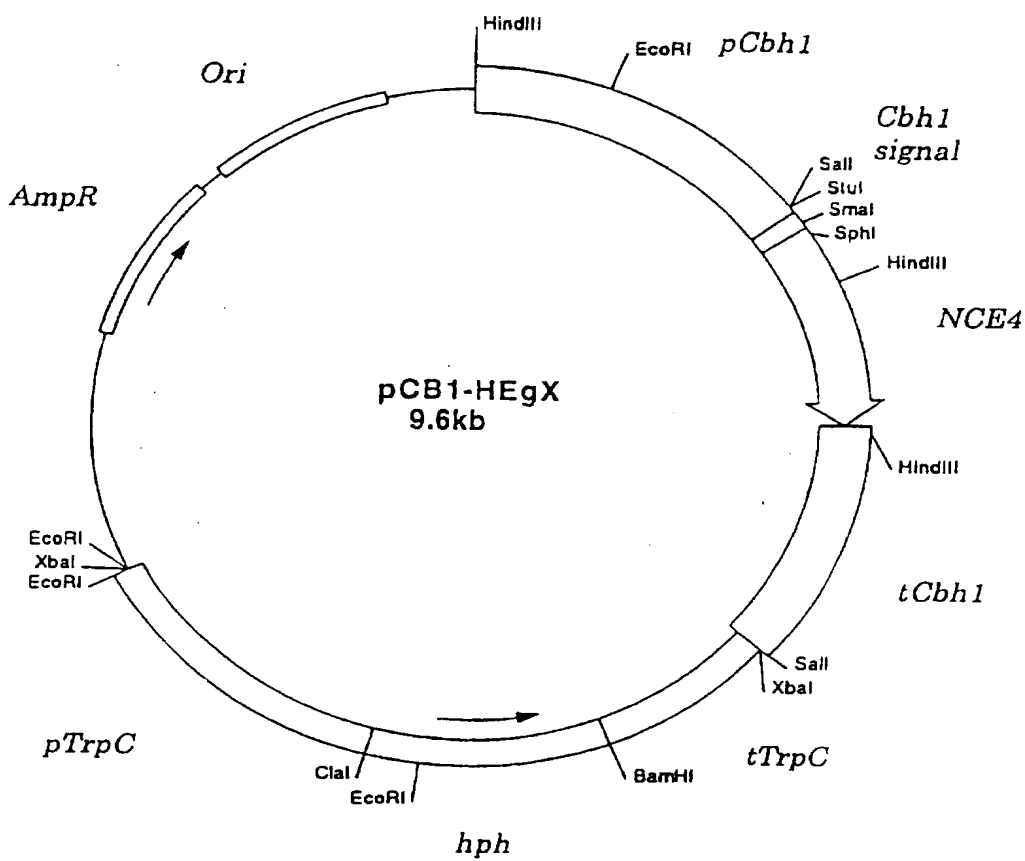


FIG. 5

6 / 7

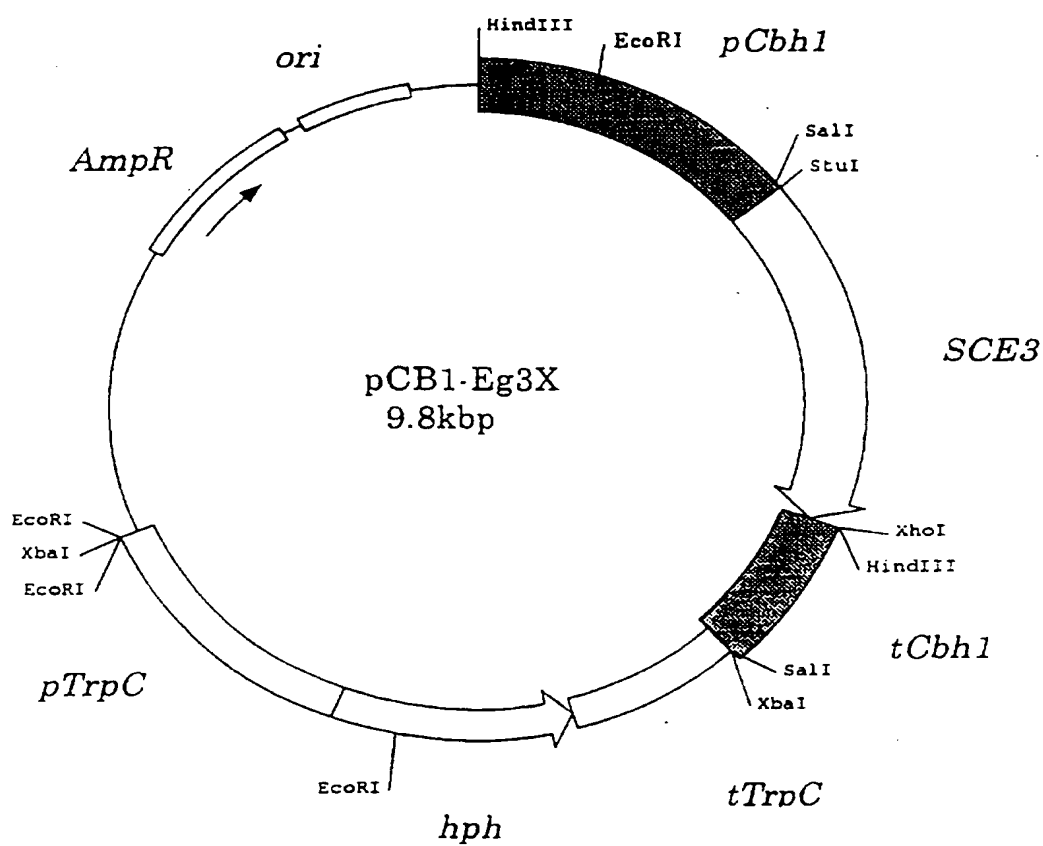


FIG. 6

7/7

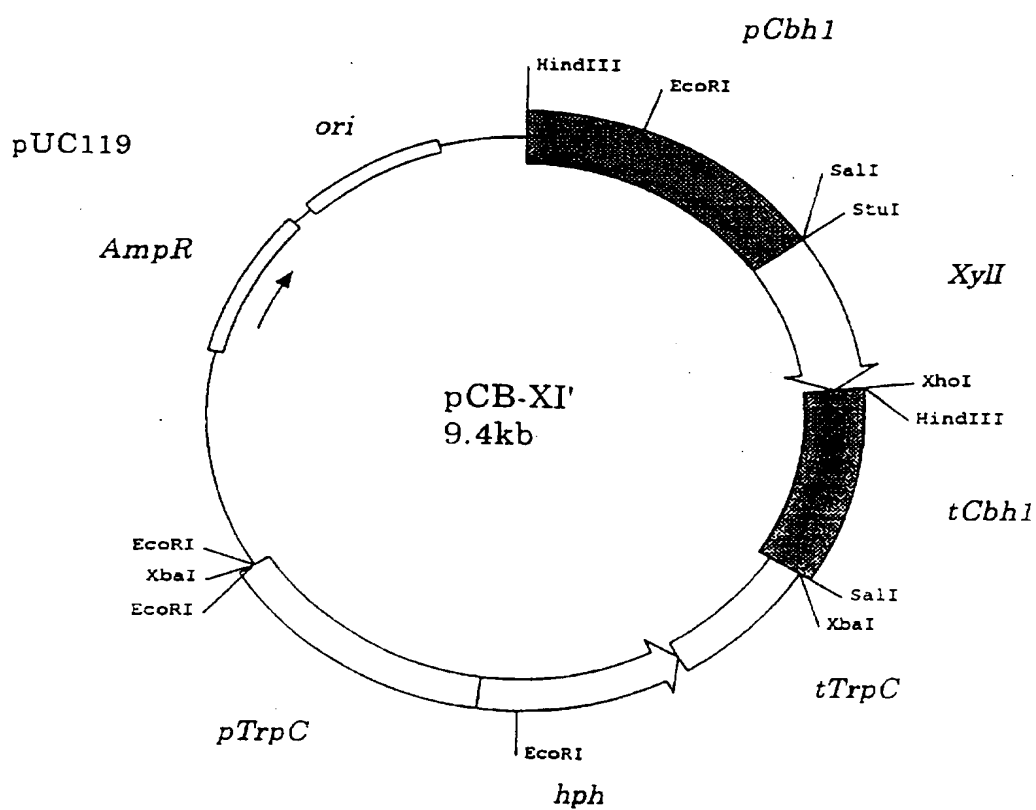


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl⁶ C12N15/80, C12N15/04, C12N9/42, C12N9/24, C12N1/15 // (C12N15/04, C12R1:885), (C12N9/42, C12R1:885), (C12N9/24, C12R1:885), (C12N1/15, C12R1:885)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N1/, C12N9/, C12N15/

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank (Genetyx), EMBL (Genetyx)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHENG, C. et al. "Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from Trichoderma viride", Nucleic Acids Research (1990) Vol. 18, No. 18 p. 5559	1, 5-12, 14, 21-22, 24, 31-34
Y		15-16, 19-20, 25-28
A		2-4, 13, 17-18, 23, 29-30
Y	JP, 5-509223, A (Novo Nordisk A/S), December 22, 1993 (22. 12. 93) & WO, 91/17243, A & AU, 9178874, A & FI, 9205079 & EP, 531372 & BR, 9106435, A	15 - 16
Y	SUNG, W.L. et al. "Expression of Trichoderma reesei and Trichoderma viride xylanases in Escherichia coli", Biochemistry and Cell Biology (1995), Vol. 73, Nos. 5, 6, p. 253-259	19 - 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 8, 1997 (08. 12. 97)

Date of mailing of the international search report

December 16, 1997 (16. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03268

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHENG, C. et al. "Efficient production of Taka-amylase A by <i>Trichoderma viride</i> ", Agricultural and Biological Chemistry (1991) Vol. 55, No. 7, p. 1817-1822	25 - 28
A	KIM, D.W. et al. "Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from <i>Trichoderma viride</i> ", Journal of Fermentation and Bioengineering (1994), Vol. 77, No. 4, p. 363-369	17 - 18

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/03268

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.¹ C12N 15/80, C12N 15/04, C12N 9/42, C12N 9/24, C12N 1/15 // (C12N 15/04, C12R 1:885)
(C12N 9/42, C12R 1:885), (C12N 9/24, C12R 1:885), (C12N 1/15, C12R 1:885)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.¹ C12N 1/, C12N 9/, C12N 15/

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank (Genetyx),
EMBL (Genetyx)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	CHENG, C. et al. "Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from <i>Trichoderma viride</i> ", Nucleic Acids Research (1990) 第18巻, 第18号 p. 5559	1, 5-12, 14, 21-22, 24, 31-34
Y		15-16, 19-20, 25-28
A		2-4, 13, 17-18, 23, 29-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.97

国際調査報告の発送日

16.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9 3 5 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP.5-509223.A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ) 22.12月.1993 (22.12.93) &WO.91/17243.A &AU.9178874.A &FI.9205079 &EP.531372 &BR.9106435.A	15-16
Y	SUNG, W. L. et al. "Expression of Trichoderma reesei and Trichoderma viride xylanases in Escherichia coli". Biochemistry and Cell Biology (1995) 第73巻, 第5-6号 p. 253-259	19-20
Y	CHENG, C. et al. "Efficient production of Taka-amylase A by Trichoderma viride", Agricultural and Biological Chemistry (1991) 第55巻, 第7号 p. 1817-1822	25-28
A	KIM, D. W. et al. "Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from Trichoderma viride", Jurnal of Fermentation and Bioengineering (1994) 第77巻, 第4号 p. 363-369	17-18

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.